

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

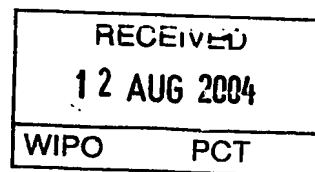
25. 6. 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日            2 0 0 3 年   6 月 2 5 日  
Date of Application:

出 願 番 号            特 願 2 0 0 3 - 1 8 1 9 1 5  
Application Number:  
[ST. 10/C]:            [ J P 2 0 0 3 - 1 8 1 9 1 5 ]



出 願 人            独立行政法人産業技術総合研究所  
Applicant(s):

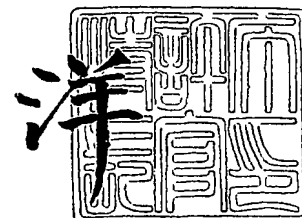
BEST AVAILABLE COPY

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年   7 月 2 9 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願

【整理番号】 J103624054

【提出日】 平成15年 6月25日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61B 10/00

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県尼崎市若王寺3丁目11番46号 独立行政法人  
産業技術総合研究所 関西センター尼崎事業所内

【氏名】 三宅 正人

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県尼崎市若王寺3丁目11番46号 独立行政法人  
産業技術総合研究所 関西センター尼崎事業所内

【氏名】 吉川 智啓

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県尼崎市若王寺3丁目11番46号 独立行政法人  
産業技術総合研究所 関西センター尼崎事業所内

【氏名】 三宅 淳

【特許出願人】

【識別番号】 301021533

【氏名又は名称】 独立行政法人 産業技術総合研究所

【代理人】

【識別番号】 100078282

【弁理士】

【氏名又は名称】 山本 秀策

【選任した代理人】

【識別番号】 100062409

【弁理士】

【氏名又は名称】 安村 高明

【選任した代理人】

【識別番号】 100113413

【弁理士】

【氏名又は名称】 森下 夏樹

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 細胞プロファイルデータ生成のための方法および装置

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 複数の同一環境にある細胞の情報に関するプロファイルデータを生成する方法であって、

a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体上に配置する工程；および

b) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして該細胞のプロファイルのデータを生成する工程；  
を包含する、方法。

【請求項 2】 前記生物学的因子は、核酸分子または該核酸分子に由来する分子である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 前記細胞は、a) 正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体；および b) 塩、を含む、組成物によって、前記支持体に固定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】 前記細胞には、アクチン作用物質が提供される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】 前記細胞は、a) 正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体；および b) 塩、を含む、組成物によって、前記支持体に固定され、かつ、アクチン作用物質が提供される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】 前記生物学的因子は、核酸分子、タンパク質、糖鎖、脂質、低分子、それらの複合分子からなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】 前記細胞は、モニター前に少なくとも約 3 日間培養される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】 前記生物学的因子は、遺伝子をコードする核酸分子を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】 前記プロファイルは、遺伝子発現のプロファイルを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】 前記プロファイルは、アポトーシスシグナルのプロファイ



ルを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】 前記プロファイルは、ストレスシグナルのプロファイルである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】 前記プロファイルは、分子の局在化に関するプロファイルである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】 前記分子は、蛍光、燐光、放射性物質またはその組み合わせにて標識される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】 前記プロファイルは、細胞形態の変化を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】 前記プロファイルは、プロモーターのプロファイルを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】 前記プロファイルは、特定薬剤依存性のプロモーターのプロファイルを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】 前記プロファイルは、特定薬剤依存性のプロモーターのプロファイルを含み、前記特定薬剤を投与するさらに工程を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】 外来因子が前記細胞に提供される工程をさらに包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 19】 前記外来因子は、RNAi を含む、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】 前記外来因子は、生体に存在しない化学物質を含む、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 21】 前記プロファイルは、分子間相互作用のプロファイルを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 22】 前記外来因子は、前記細胞のレセプターに対するリガンドを含む、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 23】 前記プロファイルは、レセプターリガンド相互作用のプロファイルを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 24】 前記プロファイルは細胞形態であり、前記方法は、遺伝子

の過剰発現、過小発現もしくはノックダウン、外来因子の添加および環境の変化からなる群より選択される、刺激を該細胞に与える工程をさらに包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 25】 前記プロファイルは、前記細胞内に存在する分子間の相互作用のプロファイルを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 26】 前記方法は、ツーハイブリッド法、FRET および BRET からなる群より選択される技術を用いた観察を行う工程をさらに包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 27】 前記プロファイルは、前記細胞内に存在する分子間の相互作用のプロファイルを含み、前記方法は、ツーハイブリッド法、FRET および BRET からなる群より選択される技術を用いた観察を行う工程をさらに包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 28】 前記細胞は、前記支持体上にアレイ状に配置される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 29】 前記細胞は、前記支持体上にアレイ状に配置され、前記複数の細胞は、各々が最大 1 mm の間隔をあけて配置される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 30】 前記プロファイルはリアルタイムに得られる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 31】 前記細胞を固相支持体に固定する工程をさらに包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 32】 前記データは、前記プロファイルに関する情報を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 33】 前記データは、前記モニターにおける条件に関する情報を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 34】 前記データは、前記細胞の状態に関する情報を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 35】 前記モニターされる生物学的因子は、少なくとも 2 種の生物学的因子を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 36】 前記モニターされる生物学的因子は、少なくとも 3 種の生物学的因子を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 37】 前記モニターされる生物学的因子は、少なくとも 8 種の生物学的因子を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 38】 生物学的因子を任意に選択する工程をさらに包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 39】 前記細胞は、幹細胞および体細胞からなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 40】 前記支持体は、固相支持体を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 41】 前記支持体は、基板を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 42】 前記生物学的因子は核酸分子であり、前記細胞は、該核酸分子でトランスフェクトされる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 43】 前記トランスフェクトは固相上または液相中で行われる、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】 前記トランスフェクトは固相上で行われる、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 45】 前記プロファイルの位相を比較する工程を包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 46】 前記細胞のプロファイルとコントロールプロファイルとの差分をとる工程を包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 47】 前記プロファイルは、信号処理法および多変量解析からなる群より選択される数学処理により処理される工程をさらに包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 48】 複数の同一環境にある細胞の情報に関するプロファイルデータを提示方法であって、

a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体上に配置する工程；

b) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして該細胞のプロファイルのデータを生成する工程；および

c) 該データを提示する工程、  
を包含する、方法。

【請求項 49】 前記提示はリアルタイムである、請求項 48 に記載の提示方法。

【請求項 50】 前記提示は、視覚で感知されるように行われる、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 51】 前記提示は、聴覚で感知されるように行われる、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 52】 同一環境にある細胞の状態を判定する方法であって、

- a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体上に配置する工程；
- b) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして該細胞のプロファイルのデータを生成する工程；および
- c) 該データから該細胞の状態を判定する工程、  
を包含する、方法。

【請求項 53】 前記プロファイルと前記細胞の状態とを予め関連付ける工程をさらに包含する、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 54】 前記細胞は、状態が既知の細胞を含む、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 55】 前記生物学的因子は、少なくとも 2 種存在する、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 56】 前記生物学的因子を任意に選択する工程をさらに包含する、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 57】 前記データは、リアルタイムで生成される、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 58】 前記状態は、分化状態、未分化状態、外来因子に対する細胞応答、細胞周期および増殖状態からなる群より選択される、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 59】 前記細胞は、幹細胞および体細胞からなる群より選択される、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 60】 前記固相支持体は、基板を含む、請求項 52 に記載の方法

。

【請求項 61】 前記生物学的因子は核酸分子であり、前記細胞は該核酸分子でトランスフェクトされる、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 62】 前記トランスフェクトは固相上または液相中で行われる、請求項 61 に記載の方法。

【請求項 63】 前記生物学的因子は、他の生物学的因子に結合する能力を有する、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 64】 前記判定工程 c) は、前記プロファイルの位相を比較することを包含する、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 65】 前記判定工程 c) は、前記プロファイルとコントロールプロファイルとの差分をとる工程を包含する、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 66】 前記判定工程 c) は、信号処理法および多変量解析からなる群より選択される数学処理を包含する、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 67】 外来因子と、該外来因子に対する細胞の応答とを相関付ける方法であって、

a) 細胞を、複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体上で、外来因子に曝露する工程；

b) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして該細胞のプロファイルのデータを生成する工程；および

c) 該外来因子と、該プロファイルとを相関付ける工程；  
を包含する、方法。

【請求項 68】 前記細胞は、前記支持体に固定される、請求項 67 に記載の方法。

【請求項 69】 少なくとも 2 つの前記外来因子を使用して、各外来因子に対するプロファイルを得る工程をさらに包含する、請求項 67 に記載の方法。

【請求項 70】 少なくとも 2 つの前記プロファイルを類別することにより、該プロファイルに対応する外来因子を類別する工程をさらに包含する、請求項 67 に記載の方法。

【請求項 7 1】 前記プロファイルは、リアルタイムで提示される、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 2】 前記細胞は、アレイ上で培養される、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 7 3】 前記工程 (b) におけるプロファイルのモニターは、前記アレイから画像データを得ることを包含する、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 7 4】 前記 (c) における前記外来因子と前記プロファイルとを相関付ける工程は、前記プロファイルの位相の異同を識別する工程である、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 7 5】 前記外来因子は、温度変化、湿度変化、電磁波、電位差、可視光線、赤外線、紫外線、X線、化学物質、圧力、重力変化、ガス分圧および浸透圧からなる群から選択される、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 7 6】 前記化学物質は、生体分子、化学合成物または培地である、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 7 7】 前記生体分子は、核酸分子、タンパク質、脂質、糖、プロテオリピッド、リポプロテイン、糖タンパク質およびプロテオグリカンからなる群から選択される、請求項 7 6 に記載の方法。

【請求項 7 8】 前記生体分子は、ホルモン、サイトカイン、細胞接着因子および細胞外マトリクスからなる群より選択される少なくとも 1 つの生体分子を含む、請求項 7 6 に記載の方法。

【請求項 7 9】 前記化学物質は、レセプターのアゴニストまたはアンタゴニストである、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 8 0】 細胞のプロファイルから、細胞に与えられた未同定の外来因子を同定するための方法であって、

a) 細胞に、同一環境を保つことができる支持体上で、複数の既知の外来因子を曝露する工程；

b) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターし、既知の外来因子の各々に対する該細胞のプロファイルを得て該細胞のプロファイルのデータを生成する工程；

c) 該既知の外来因子の各々と、該プロファイルの各々とを相関付ける工程；

d) 該細胞を未同定の外来因子に曝露する工程；

e) 外来因子に曝露された該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして、未同定の外来因子に関する該細胞のプロファイルを得る工程；

f) 該工程 (b) で得られたプロファイルの中から、該工程 (e) で得られたプロファイルに対応するプロファイルを決定する工程；および

g) 該未同定の外来因子は、該工程 (f) において決定されたプロファイルに対応する該既知の外来因子であることを決定する工程；  
を包含する、方法。

【請求項 8 1】 細胞のプロファイルから、細胞に与えられた未同定の外来因子を同定するための方法であって、

a) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体に関し、既知の外来因子と、該既知の外来因子に対応する該細胞のプロファイルとの相関関係に関するデータを提供する工程；

b) 該細胞を未同定の外来因子に曝露する工程；

c) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして、該細胞のプロファイルを得る工程；

d) 該工程 (a) において提供された、該プロファイルの中から、該工程 (c) において得られたプロファイルに対応するプロファイルを決定する工程；および

e) 該未同定の外来因子は、該決定されたプロファイルに対応する該既知の外来因子であることを決定する工程；  
を包含する、方法。

【請求項 8 2】 複数の同一環境にある細胞の情報に関するプロファイルを得る方法であって、

a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体上に配置する工程；および

b) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニ

ターして該細胞のプロファイルを得る工程、  
を包含する、方法。

【請求項 83】 請求項 1 に記載の方法によつて生成されたデータが格納される記録媒体。

【請求項 84】 前記記録媒体は、前記モニターにおける条件に関する情報、前記プロファイルに関する情報、前記細胞の状態に関する情報および前記生物学的因子に関する情報からなる群より選択される、少なくとも 1 つの情報に関するデータをさらに含む、請求項 83 に記載の記録媒体。

【請求項 85】 前記データは、互いにリンクされた形態で格納される、請求項 84 に記載の記録媒体。

【請求項 86】 前記データは、前記細胞ごとにリンクされて格納される、請求項 84 に記載の記録媒体。

【請求項 87】 請求項 1 に記載された方法によって生成されたデータ。

【請求項 88】 請求項 1 に記載された方法によって生成されたデータを含む伝送媒体。

【請求項 89】 同一環境にある複数の細胞の情報に関するプロファイルデータを生成するシステムであつて、

- a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体；
  - b) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターする手段；および
  - c) 該モニター手段から得られた信号から該細胞のプロファイルのデータを生成する手段；
- を備える、システム。

【請求項 90】 複数の細胞をさらに含み、該複数の細胞は前記支持体に固定される、請求項 89 に記載のシステム。

【請求項 91】 前記支持体には、塩およびアクチン作用物質からなる群より選択される少なくとも 1 つの物質が付着される、請求項 90 に記載のシステム。

【請求項 92】 前記モニター手段は、光学顕微鏡、蛍光顕微鏡、位相顕微



鏡、レーザー光源を用いた読取装置、表面プラズモン共鳴（SPR）イメージング、電気信号、化学的または生化学的マーカーのいずれかあるいは複数種を用いる手段、放射光、共焦点顕微鏡、非共焦点顕微鏡、微分干涉顕微鏡、実体顕微鏡、ビデオモニターおよび赤外線カメラからなる群より選択される少なくともひとつの手段を含む、請求項 89 に記載のシステム。

【請求項 93】 複数の同一環境にある細胞の情報に関するプロフィールを提示するシステムであって、

- a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体；
  - b) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターする手段；
  - c) 該モニター手段から得られた信号から該細胞のプロファイルのデータを生成する手段；および
  - d) 該データを提示する手段、
- を備える、システム。

【請求項 94】 複数の細胞をさらに含み、該複数の細胞は前記支持体に固定される、請求項 93 に記載のシステム。

【請求項 95】 前記支持体には、塩およびアクチン作用物質からなる群より選択される少なくとも 1 つの物質が付着される、請求項 93 に記載のシステム。

【請求項 96】 前記モニター手段は、光学顕微鏡、蛍光顕微鏡、位相顕微鏡、レーザー光源を用いた読取装置、表面プラズモン共鳴（SPR）イメージング、電気信号、化学的または生化学的マーカーのいずれかあるいは複数種を用いる手段、放射光、共焦点顕微鏡、非共焦点顕微鏡、微分干涉顕微鏡、実体顕微鏡、ビデオモニターおよび赤外線カメラからなる群より選択される少なくともひとつの手段を含む、請求項 93 に記載のシステム。

【請求項 97】 前記データを提示する手段は、ディスプレイである、請求項 93 に記載のシステム。

【請求項 98】 前記データを提示する手段は、スピーカである、請求項 93 に記載のシステム。

【請求項 99】 細胞の状態を判定するシステムであって、

- a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体；
  - b) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターする手段；
  - c) 該モニター手段から得られた信号からデータを生成する手段；および
  - d) 該データから該細胞の状態を外挿する手段、
- を備える、システム。

【請求項 100】 外来因子と、該外来因子に対する細胞の応答とを相関付けるシステムであって、

- a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体；
  - b) 外来因子を曝露する手段；
  - c) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターする手段；
  - d) 該モニター手段からの信号から、該細胞のプロファイルのデータを生成する工程；および
  - e) 該外来因子と、該プロファイルとを相関付ける手段；
- を備える、システム。

【請求項 101】 細胞のプロファイルから、細胞に与えられた未同定の外来因子を同定するためのシステムであって、

- a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体；
- b) 既知の外来因子を曝露する手段；
- c) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターする手段；
- d) 外来因子の各々に対する該細胞のプロファイルを得て該細胞のプロファイルのデータを生成する手段；
- e) 該既知の外来因子の各々と、該プロファイルの各々とを相関付ける手段；
- f) 該細胞を未同定の外来因子に曝露する手段；
- g) 該手段 (d) で得られた既知の外来因子のプロファイルと、未知の外来因子のプロファイルとを比較し、既知の外来因子のプロファイルの中から、未知の

外来因子のプロファイルに対応するプロファイルを決定する手段であって、該決定された未同定の外来因子は、該決定されたプロファイルに対応する該既知の外来因子である、手段、  
を備える、システム。

【請求項 102】 細胞のプロファイルから、細胞に与えられた未同定の外来因子を同定するためのシステムであって、

a) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体に関し、既知の外来因子と、該既知の外来因子に対応する該細胞のプロファイルとの相関関係に関するデータが格納された記録媒体；

b) 該細胞を未同定の外来因子に曝露する手段；

c) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体；

d) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターする手段；

e) 該モニター手段から得られた信号から、該細胞のプロファイルを得る手段；

f) 該記録媒体 (a) において格納される該プロファイルの中から、未知の外来因子に関して得られたプロファイルに対応するプロファイルを決定する手段であって、該未同定の外来因子は、該決定されたプロファイルに対応する該既知の外来因子である、手段；

を備える、システム。

【請求項 103】 複数の細胞を固定し得、かつ、該細胞の環境を同一に維持し得る支持体。

【請求項 104】 前記支持体上の細胞は、アレイ状に配置され得る、請求項 103 に記載の支持体。

【請求項 105】 塩および正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体、またはアクチン作用物質を含む、請求項 103 に記載の支持体。

【請求項 106】 塩および正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体、ならびにアクチン作用物質を含む、請求項 103 に記載の支持体。

【請求項 107】 前記細胞は、最大 1 mm 以下の間隔で配置され得る、請

求項 103 に記載の支持体。

【請求項 108】 固定された細胞をさらに含む、請求項 103 に記載の支持体。

【請求項 109】 固定された生物学的因子をさらに含む、請求項 104 に記載の支持体。

【請求項 110】 前記生物学的因子は 2 種類以上固定される、請求項 109 に記載の支持体。

【請求項 111】 細胞および生物学的因子が固定される、請求項 103 に記載の支持体。

【請求項 112】 塩および正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体と、アクチン作用物質とが、細胞および生物学的因子とともに固定される、請求項 103 に記載の支持体。

【請求項 113】 塩および正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体と、アクチン作用物質とが、細胞および生物学的因子とともにアレイ状に固定される、請求項 103 に記載の支持体。

【請求項 114】 塩と、遺伝子導入試薬と、アクチン作用物質と、核酸分子と、細胞とがアレイ状に固定される、請求項 104 に記載の支持体。

【請求項 115】 前記塩は、塩化カルシウム、リン酸水素ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、ピルビン酸ナトリウム、H E P E S、塩化カルシウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫化マグネシウム、硝酸鉄、アミノ酸およびビタミンからなる群より選択される塩を含む、請求項 114 に記載の支持体。

【請求項 116】 前記遺伝子導入試薬は、カチオン性高分子、カチオン性脂質、ポリアミン系試薬、ポリイミン系試薬、リン酸カルシウム、オリゴフェクタミンおよびオリゴフェクターからなる群より選択される少なくともひとつの試薬を含む、請求項 114 に記載の支持体。

【請求項 117】 前記アクチン作用物質は、フィブロネクチン、ラミニンおよびビトロネクチンからなる群より選択される少なくとも 1 つのタンパク質またはその改変体もしくはフラグメントを含む、請求項 114 に記載の支持体。

【請求項 118】 前記核酸分子は、サイトカイン、ホルモン、細胞接着因

子、細胞骨格タンパク質および酵素からなる群より選択されるタンパク質をコードする配列を含む、請求項 114 に記載の支持体。

【請求項 119】 前記細胞は、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、細菌細胞および真菌細胞からなる群より選択される細胞を含む、請求項 114 に記載の支持体。

【請求項 120】 前記支持体の材料は、ガラス、シリカ、およびプラスチックからなる群より選択される材料を含む、請求項 114 に記載の支持体。

【請求項 121】 固定された複数の細胞を含み、かつ、該細胞の環境を同一に維持し得る支持体を生産する方法であって、

A) 支持体を提供する工程；および

B) 細胞を塩および正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体を用いて該支持体上に固定する工程、を含む、方法。

【請求項 122】 前記固定工程は、前記塩と、前記正に荷電した物質としての遺伝子導入試薬と、アクチン作用物質と、前記負に荷電した物質としての核酸分子と、前記細胞との混合物を、アレイ状に固定することを含む、請求項 121 に記載の方法。

【請求項 123】 前記固定工程は、プリント工程を含む、請求項 121 に記載の方法。

【請求項 124】 前記支持体の提供は、支持体材料から該支持体を作製する工程を包含する、請求項 121 に記載の方法、。

【請求項 125】 固定された複数の細胞を含み、かつ、該細胞の環境を同一に維持し得る支持体を生産する装置であって、

A) 支持体を提供する手段；および

B) 細胞を塩および正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体を用いて該支持体上に固定する手段を備える、装置。

【請求項 126】 前記固定手段は、プリント手段を含む、請求項 125 に記載の装置。

【請求項 127】 前記支持体提供手段は、支持体材料から前記支持体を成型する手段を含む、請求項 125 に記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、細胞の解析技術の分野にある。より詳細には、同一の環境にある細胞のプロファイルを提供する方法およびそのためのシステム、ならびにそのような技術によって得られたデータおよびデータ配列技術に関する。

【0002】

【従来の技術】

生物の生存は、細胞外シグナルを認知し、そしてその細胞外シグナルに応答するそれらの能力に依存する。分子レベルにおいて、シグナルは、細胞のホメオスタシスを維持するように協同して作用し、そして増殖、分裂および分化のような活性を調節する相互作用タンパク質のネットワークを介して、認知され、そして伝達される。生物学的シグナル伝達ネットワークを通じた情報伝達は、主に、シグナルに応答して動的に集合および分解し得るタンパク質-タンパク質相互作用によって媒介され、外部事象を遺伝子発現における変化のような特定の結果に連結させる一過性の回路を作製する。これらのネットワークの基礎となるタンパク質-タンパク質相互作用をマップするために、多数の戦略が開発されている、そしてこれらの研究は、集合的に、*Saccharomyces cerevisiae* および他の生物について、ゲノム全体にわたるタンパク質-タンパク質相互作用の輪郭を描く豊富なデータを提供している。これらの手段は、非常に強力であるが、部分的に完成した像を提供するだけであって、おそらく、微妙な状況にある多くの相互作用（その相互作用は、それらの適切なシグナルが存在する場合にのみ、形成される）を見逃している。

【0003】

変異または低分子によるタンパク質-タンパク質相互作用の崩壊は、細胞表現型における大きな変化を誘発するシグナル伝達ネットワークの小さな混乱を可能にする生物学的な支柱を作製し得るが、所定のシグナル伝達経路における全ての

タンパク質-タンパク質相互作用がこの力を保有するわけではないようである。従って、調節性タンパク質-タンパク質相互作用を同定することを目的とする補完的な戦略が、シグナル伝達研究および先導する開発の両方において、特別な役割を果たす。この点からして、タンパク質-タンパク質相互作用を規定し、そしてその相互作用に混乱を起こす相補的な手段とは、細胞中へタンパク質またはペプチドを人工的に導入し（これは、目的の内因性調節相互作用と競合し、そしてその関係を崩す（t i t r a t e - o u t））。それによって外部シグナルを細胞応答に連結させる正常な回路を破壊することである。機能的なアッセイ（例えば、シグナルに応答した遺伝子の活性化）とこの戦略を合わせることによって、機能的な妨害についてのスクリーニングは、調節性タンパク質-タンパク質相互作用を混乱させるペプチドを同定するために使用され得る。この戦略（しばしば、ドミナント妨害遺伝学またはドミナントネガティブ遺伝学と称される）は、いくつかのモデル生物において好首尾に使用され（ここで、高スループットのスクリーニング方法が、容易に適用されている、そして哺乳動物においてより少ない程度で使用されている（旧来、哺乳動物は、この型のスクリーニングの対象となりにくい）。ドミナントネガティブ戦略の1つの能力は、この戦略が機能的に関連するタンパク質-タンパク質相互作用の「支柱の点」の位置を正確に示し、それによって、外部の因子による機能的な調節を受けやすいタンパク質ネットワークの大きな網の中で、少ない数の中心点をあらわにすることである。従って、ドミナントネガティブ戦略の結果は、特定の経路を規定する調節成分に関する極めて重大な情報を提供し得、そして薬物スクリーニングプログラムによって標的化するのに適した重要なタンパク質-タンパク質相互作用を解明し得る。

#### 【0004】

哺乳動物においてドミナントネガティブスクリーニングを開発する際の進行を妨げるもののうちの1つは、トランスフェクト細胞またはトランスジェニック生物の作製である。この問題に取り組むための1つの手段として高効率のレトロウイルストランスフェクションが開発されている。このレトロウイルストランスフェクションは、強力であるが、ウイルス中間体にパッケージングされるDNAの作製を必要とし、全ての適用に適切な戦略ではない。相補的な手段として、高密

度トランスフェクションアレイすなわち細胞アレイの使用が提唱されている。

#### 【0005】

Rosetta Inpharmaticsは、種々の特許出願において、細胞の情報をプロファイルとして提供することを提案している（特許文献1～11）。しかし、このようなプロファイルは、いずれも、環境の異なる別々の細胞からの情報を連続情報としてではなく、別個の情報の集合として処理しており、真の意味で、同一条件で、一個の（同じ）細胞に注目した情報解析を行っていないという点で限界がある。特に、このような技術では、ある変化の前後の特定の各一時点のみに注目して解析がなされており、ある一点（遺伝子）がとる時間的変化のプロセスを解析するものではない。

#### 【0006】

プロファイルまたはプロファイリングについては、近年の技術の進歩により、細胞の構成要素を正確に測定すること、それゆえにプロファイルを導出することが可能になってきている（（例えば、非特許文献1～3；特許文献13）。ゲノム全体が知られている生物では、その細胞内の全遺伝子の転写産物を分析することが可能である。ゲノムの情報が増えつつあるヒトのような他の生物の場合には、細胞内の多数の遺伝子を同時にモニタリングすることが可能である。

#### 【0007】

アレイ技術の進展により、薬物探索の分野などでもアレイが使用されている（例えば、非特許文献4～5）。プロファイルを用いた解析（例えば、特許文献14を参照）およびプロファイルのクラスター化は、細胞の状態の詳細な解析、移植、薬物の分子標的ならびに薬物候補および／または薬物の関連機能、効力および毒性に関する情報を与える。このような比較は理想的な薬物活性または疾病状態を表す共通のプロファイルを誘導するためにも使用できる。さらに、プロファイルの比較は、患者の疾病を初期段階で検出するのに役立ち、病気があると診断された患者のための改善された臨床結果の予測を提供することができる。

#### 【0008】

しかし、真の意味で同一条件下で同じ細胞に関する情報を提供した例はいまだなく、上述の技術では、ヘテロな細胞集団の平均値としてデータが提示されるこ



とから、そのようなデータに基づく種々の解析および評価は、正確性に欠けると  
いう欠点が存在する。従って、真の意味での細胞レベルでの状態を提示するため  
の方法への需要が高まっている。

【 0 0 0 9 】

【特許文献 1】

特表2003-505038号

【特許文献 2】

特表2003-505022号

【特許文献 3】

特表2002-533701号

【特許文献 4】

特表2002-533700号

【特許文献 5】

特表2002-533699号

【特許文献 6】

特表2002-528095号

【特許文献 7】

特表2002-526757号

【特許文献 8】

特表2002-518021号

【特許文献 9】

特表2002-518003号

【特許文献 1 0】

特表2002-514804号

【特許文献 1 1】

特表2002-514773号

【特許文献 1 2】

特表2002-514437号

【特許文献 1 3】

米国特許第5,569,588号

【特許文献14】

米国特許第5,777,888号

【非特許文献1】

Schenaら, 1995, Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA micro-array, Science 270:467-470

【非特許文献2】

Lockhartら, 1996, Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays, Nature Biotechnology 14:1675-1680

【非特許文献3】

Blanchardら, 1996, Sequence to array: Probing the genome's secrets, Nature Biotechnology 14:1649

【非特許文献4】

Marionら, 1998, Drug target validation and identification of secondary drug target effects using Microarrays, Nat Med. 1998 Nov;4(11):1293-301

【非特許文献5】

Grayら, 1998, Exploiting chemical libraries, structure, and genomics in the search for kinase inhibitors, Science 281:533-538

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、同一の環境条件下で、細胞の状態に関する情報・データを得る方法、およびそのようなデータを正確に提示するための方法およびシステムを提供することを課題とする。特に、同一環境条件下で細胞レベルでの情報を、複雑系という観点でそのままあるいは直接的に提示するシステムおよび方法ならびにそのようなデータおよびデータ配列技術そのものを提供することを課題とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】

上記課題は、複数の細胞を同一環境下に配置することができる支持体を提供す

ることによって達成された。そのような支持体は、例えば、塩またはアクチン作用物質、好ましくは塩およびアクチン作用物質の両方を使用して細胞を固定することによって達成された。これにより、同一環境下に配置された同一種の細胞のプロファイルと同時にかつ同一条件下で収集することが可能になる。

【0012】

従って、本発明は、以下の発明を提供する。

【0013】

(1) 複数の同一環境にある細胞の情報に関するプロファイルデータを生成する方法であって、

a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体上に配置する工程；および

b) 上記細胞上または上記細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして上記細胞のプロファイルのデータを生成する工程；  
を包含する、方法。

【0014】

(2) 上記生物学的因子は、核酸分子または上記核酸分子に由来する分子である、項目1に記載の方法。

【0015】

(3) 上記細胞は、a) 正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体；および b) 塩、を含む、組成物によって、上記支持体に固定される、項目1に記載の方法。

【0016】

(4) 上記細胞には、アクチン作用物質が提供される、項目1に記載の方法。

【0017】

(5) 上記細胞は、a) 正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体；および b) 塩、を含む、組成物によって、上記支持体に固定され、かつ、アクチン作用物質が提供される、項目1に記載の方法。

【0018】

(6) 上記生物学的因子は、核酸分子、タンパク質、糖鎖、脂質、低分子、それらの複合分子からなる群より選択される、項目 1 に記載の方法。

**【0019】**

(7) 上記細胞は、モニター前に少なくとも約 3 日間培養される、項目 1 に記載の方法。

**【0020】**

(8) 上記生物学的因子は、遺伝子をコードする核酸分子を含む、項目 1 に記載の方法。

**【0021】**

(9) 上記プロファイルは、遺伝子発現のプロファイルを含む、項目 1 に記載の方法。

**【0022】**

(10) 上記プロファイルは、アポトーシスシグナルのプロファイルを含む、項目 1 に記載の方法。

**【0023】**

(11) 上記プロファイルは、ストレスシグナルのプロファイルである、項目 1 に記載の方法。

**【0024】**

(12) 上記プロファイルは、分子の局在化に関するプロファイルである、項目 1 に記載の方法。

**【0025】**

(13) 上記分子は、蛍光、燐光、放射性物質またはその組み合わせにて標識される、項目 12 に記載の方法。

**【0026】**

(14) 上記プロファイルは、細胞形態の変化を含む、項目 1 に記載の方法。

**【0027】**

(15) 上記プロファイルは、プロモーターのプロファイルを含む、項目 1 に記載の方法。

## 【0028】

(16) 上記プロファイルは、特定薬剤依存性のプロモーターのプロファイルを含む、項目1に記載の方法。

## 【0029】

(17) 上記プロファイルは、特定薬剤依存性のプロモーターのプロファイルを含み、上記特定薬剤を投与するさらに工程を含む、項目1に記載の方法。

## 【0030】

(18) 外来因子が上記細胞に提供される工程をさらに包含する、項目1に記載の方法。

## 【0031】

(19) 上記外来因子は、RNAiを含む、項目18に記載の方法。

## 【0032】

(20) 上記外来因子は、生体に存在しない化学物質を含む、項目18に記載の方法。

## 【0033】

(21) 上記プロファイルは、分子間相互作用のプロファイルを含む、項目1に記載の方法。

## 【0034】

(22) 上記外来因子は、上記細胞のレセプターに対するリガンドを含む、項目18に記載の方法。

## 【0035】

(23) 上記プロファイルは、レセプターリガンド相互作用のプロファイルを含む、項目1に記載の方法。

## 【0036】

(24) 上記プロファイルは細胞形態であり、上記方法は、遺伝子の過剰発現、過小発現もしくはノックダウン、外来因子の添加および環境の変化からなる群より選択される、刺激を上記細胞に与える工程をさらに包含する、項目1に記載の方法。

## 【0037】

(25) 上記プロファイルは、上記細胞内に存在する分子間の相互作用のプロファイルを含む、項目1に記載の方法。

【0038】

(26) 上記方法は、ツーハイブリッド法、FRETおよびBRETからなる群より選択される技術を用いた観察を行う工程をさらに包含する、項目1に記載の方法。

【0039】

(27) 上記プロファイルは、上記細胞内に存在する分子間の相互作用のプロファイルを含み、上記方法は、ツーハイブリッド法、FRETおよびBRETからなる群より選択される技術を用いた観察を行う工程をさらに包含する、項目1に記載の方法。

【0040】

(28) 上記細胞は、上記支持体上にアレイ状に配置される、項目1に記載の方法。

【0041】

(29) 上記細胞は、上記支持体上にアレイ状に配置され、上記複数の細胞は、各々が最大1mmの間隔をあけて配置される、項目1に記載の方法。

【0042】

(30) 上記プロファイルはリアルタイムに得られる、項目1に記載の方法。

【0043】

(31) 上記細胞を固相支持体に固定する工程をさらに包含する、項目1に記載の方法。

【0044】

(32) 上記データは、上記プロファイルに関する情報を含む、項目1に記載の方法。

【0045】

(33) 上記データは、上記モニターにおける条件に関する情報を含む、項目1に記載の方法。

**【0046】**

(34) 上記データは、上記細胞の状態に関する情報を含む、項目1に記載の方法。

**【0047】**

(35) 上記モニターされる生物学的因子は、少なくとも2種の生物学的因子を含む、項目1に記載の方法。

**【0048】**

(36) 上記モニターされる生物学的因子は、少なくとも3種の生物学的因子を含む、項目1に記載の方法。

**【0049】**

(37) 上記モニターされる生物学的因子は、少なくとも8種の生物学的因子を含む、項目1に記載の方法。

**【0050】**

(38) 生物学的因子を任意に選択する工程をさらに包含する、項目1に記載の方法。

**【0051】**

(39) 上記細胞は、幹細胞および体細胞からなる群より選択される、項目1に記載の方法。

**【0052】**

(40) 上記支持体は、固相支持体を含む、項目1に記載の方法。

**【0053】**

(41) 上記支持体は、基板を含む、項目1に記載の方法。

**【0054】**

(42) 上記生物学的因子は核酸分子であり、上記細胞は、上記核酸分子でトランスフェクトされる、項目1に記載の方法。

**【0055】**

(43) 上記トランスフェクトは固相上または液相中で行われる、項目42に記載の方法。

**【0056】**

(44) 上記トランスフェクトは固相上で行われる、項目42に記載の方法

。

【0057】

(45) 上記プロファイルの位相を比較する工程を包含する、項目1に記載の方法。

【0058】

(46) 上記細胞のプロファイルとコントロールプロファイルとの差分をとる工程を包含する、項目1に記載の方法。

【0059】

(47) 上記プロファイルは、信号処理法および多変量解析からなる群より選択される数学処理により処理される工程をさらに包含する、項目1に記載の方法。

【0060】

(48) 複数の同一環境にある細胞の情報に関するプロファイルデータを提示方法であって、

a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体上に配置する工程；

b) 上記細胞上または上記細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして上記細胞のプロファイルのデータを生成する工程；および

c) 上記データを提示する工程、  
を包含する、方法。

【0061】

(49) 上記提示はリアルタイムである、項目48に記載の提示方法。

【0062】

(50) 上記提示は、視覚で感知されるように行われる、項目48に記載の方法。

【0063】

(51) 上記提示は、聴覚で感知されるように行われる、項目48に記載の方法。

【0064】



(52) 同一環境にある細胞の状態を判定する方法であって、

- a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体上に配置する工程；
  - b) 上記細胞上または上記細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして上記細胞のプロファイルのデータを生成する工程；および
  - c) 上記データから上記細胞の状態を判定する工程、
- を包含する、方法。

**【0065】**

(53) 上記プロファイルと上記細胞の状態とを予め関連付ける工程をさらに包含する、項目52に記載の方法。

**【0066】**

(54) 上記細胞は、状態が既知の細胞を含む、項目52に記載の方法。

**【0067】**

(55) 上記生物学的因子は、少なくとも2種存在する、項目52に記載の方法。

**【0068】**

(56) 上記生物学的因子を任意に選択する工程をさらに包含する、項目52に記載の方法。

**【0069】**

(57) 上記データは、リアルタイムで生成される、項目52に記載の方法。

**【0070】**

(58) 上記状態は、分化状態、未分化状態、外来因子に対する細胞応答、細胞周期および増殖状態からなる群より選択される、項目52に記載の方法。

**【0071】**

(59) 上記細胞は、幹細胞および体細胞からなる群より選択される、項目52に記載の方法。

**【0072】**

(60) 上記固相支持体は、基板を含む、項目52に記載の方法。

**【0073】**

(61) 上記生物学的因子は核酸分子であり、上記細胞は上記核酸分子でトランスフェクトされる、項目52に記載の方法。

【0074】

(62) 上記トランスフェクトは固相上または液相中で行われる、項目61に記載の方法。

【0075】

(63) 上記生物学的因子は、他の生物学的因子に結合する能力を有する、項目52に記載の方法。

【0076】

(64) 上記判定工程c)は、上記プロファイルの位相を比較することを包含する、項目52に記載の方法。

【0077】

(65) 上記判定工程c)は、上記プロファイルとコントロールプロファイルとの差分をとる工程を包含する、項目52に記載の方法。

【0078】

(66) 上記判定工程c)は、信号処理法および多変量解析からなる群より選択される数学処理を包含する、項目52に記載の方法。

【0079】

(67) 外来因子と、上記外来因子に対する細胞の応答とを相関付ける方法であって、

a) 細胞を、複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体上で、外来因子に曝露する工程；

b) 上記細胞上または上記細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして上記細胞のプロファイルのデータを生成する工程；および

c) 上記外来因子と、上記プロファイルとを相関付ける工程；  
を包含する、方法。

【0080】

(68) 上記細胞は、上記支持体に固定される、項目67に記載の方法。

【0081】

(69) 少なくとも2つの上記外来因子を使用して、各外来因子に対するプロフィールを得る工程をさらに包含する、項目67に記載の方法。

【0082】

(70) 少なくとも2つの上記プロフィールを類別することにより、上記プロフィールに対応する外来因子を類別する工程をさらに包含する、項目67に記載の方法。

【0083】

(71) 上記プロフィールは、リアルタイムで提示される、項目70に記載の方法。

【0084】

(72) 上記細胞は、アレイ上で培養される、項目67に記載の方法。

【0085】

(73) 上記工程(b)におけるプロフィールのモニターは、上記アレイから画像データを得ることを包含する、項目67に記載の方法。

【0086】

(74) 上記(c)における上記外来因子と上記プロフィールとを相関付ける工程は、上記プロフィールの位相の異同を識別する工程である、項目67に記載の方法。

【0087】

(75) 上記外来因子は、温度変化、湿度変化、電磁波、電位差、可視光線、赤外線、紫外線、X線、化学物質、圧力、重力変化、ガス分圧および浸透圧からなる群から選択される、項目67に記載の方法。

【0088】

(76) 上記化学物質は、生体分子、化学合成物または培地である、項目75に記載の方法。

【0089】

(77) 上記生体分子は、核酸分子、タンパク質、脂質、糖、プロテオリピッド、リボプロテイン、糖タンパク質およびプロテオグリカンからなる群から選択される、項目76に記載の方法。

## 【0090】

(78) 上記生体分子は、ホルモン、サイトカイン、細胞接着因子および細胞外マトリクスからなる群より選択される少なくとも1つの生体分子を含む、項目76に記載の方法。

## 【0091】

(79) 上記化学物質は、レセプターのアゴニストまたはアンタゴニストである、項目75に記載の方法。

## 【0092】

(80) 細胞のプロファイルから、細胞に与えられた未同定の外来因子を同定するための方法であって、

a) 細胞に、同一環境を保つことができる支持体上で、複数の既知の外来因子を曝露する工程；

b) 上記細胞上または上記細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターし、既知の外来因子の各々に対する上記細胞のプロファイルを得て上記細胞のプロファイルのデータを生成する工程；

c) 上記既知の外来因子の各々と、上記プロファイルの各々とを相関付ける工程；

d) 上記細胞を未同定の外来因子に曝露する工程；

e) 外来因子に曝露された上記細胞上または上記細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして、未同定の外来因子に関する上記細胞のプロファイルを得る工程；

f) 上記工程(b)で得られたプロファイルの中から、上記工程(e)で得られたプロファイルに対応するプロファイルを決定する工程；および

g) 上記未同定の外来因子は、上記工程(f)において決定されたプロファイルに対応する上記既知の外来因子であることを決定する工程；  
を包含する、方法。

## 【0093】

(81) 細胞のプロファイルから、細胞に与えられた未同定の外来因子を同定するための方法であって、

a) 上記細胞上または上記細胞内の生物学的因子またはその集合体に関し、既知の外来因子と、上記既知の外来因子に対応する上記細胞のプロファイルとの相関関係に関するデータを提供する工程；

b) 上記細胞を未同定の外来因子に曝露する工程；

c) 上記細胞上または上記細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして、上記細胞のプロファイルを得る工程；

d) 上記工程 (a) において提供された、上記プロファイルの中から、上記工程 (c) において得られたプロファイルに対応するプロファイルを決定する工程；および

e) 上記未同定の外来因子は、上記決定されたプロファイルに対応する上記既知の外来因子であることを決定する工程；  
を包含する、方法。

#### 【0094】

(82) 複数の同一環境にある細胞の情報に関するプロファイルを得る方法であって、

a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体上に配置する工程；および

b) 上記細胞上または上記細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして上記細胞のプロファイルを得る工程、  
を包含する、方法。

#### 【0095】

(83) 項目1に記載の方法によつ生成されたデータが格納される記録媒体。

#### 【0096】

(84) 上記記録媒体は、上記モニターにおける条件に関する情報、上記プロファイルに関する情報、上記細胞の状態に関する情報および上記生物学的因子に関する情報からなる群より選択される、少なくとも1つの情報に関するデータをさらに含む、項目83に記載の記録媒体。

#### 【0097】

(85) 上記データは、互いにリンクされた形態で格納される、項目84に記載の記録媒体。

【0098】

(86) 上記データは、上記細胞ごとにリンクされて格納される、項目84に記載の記録媒体。

【0099】

(87) 項目1に記載された方法によって生成されたデータ。

【0100】

(88) 項目1に記載された方法によって生成されたデータを含む伝送媒体。

【0101】

(89) 同一環境にある複数の細胞の情報に関するプロファイルデータを生成するシステムであって、

- a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体；
  - b) 上記細胞上または上記細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターする手段；および
  - c) 上記モニター手段から得られた信号から上記細胞のプロファイルのデータを生成する手段；
- を備える、システム。

【0102】

(90) 複数の細胞をさらに含み、上記複数の細胞は上記支持体に固定される、項目89に記載のシステム。

【0103】

(91) 上記支持体には、塩およびアクチン作用物質からなる群より選択される少なくとも1つの物質が付着される、項目90に記載のシステム。

【0104】

(92) 上記モニター手段は、光学顕微鏡、蛍光顕微鏡、位相顕微鏡、レーザー光源を用いた読取装置、表面プラズモン共鳴 (SPR) イメージング、電気信号、化学的または生化学的マーカーのいずれかあるいは複数種を用いる手段、

放射光、共焦点顕微鏡、非共焦点顕微鏡、微分干渉顕微鏡、実体顕微鏡、ビデオモニターおよび赤外線カメラからなる群より選択される少なくともひとつの手段を含む、項目 89 に記載のシステム。

【0105】

(93) 複数の同一環境にある細胞の情報に関するプロファイルを提示するシステムであって、

- a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体；
  - b) 上記細胞上または上記細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターする手段；
  - c) 上記モニター手段から得られた信号から上記細胞のプロファイルのデータを生成する手段；および
  - d) 上記データを提示する手段、
- を備える、システム。

【0106】

(94) 複数の細胞をさらに含み、上記複数の細胞は上記支持体に固定される、項目 93 に記載のシステム。

【0107】

(95) 上記支持体には、塩およびアクチン作用物質からなる群より選択される少なくとも 1 つの物質が付着される、項目 93 に記載のシステム。

【0108】

(96) 上記モニター手段は、光学顕微鏡、蛍光顕微鏡、位相顕微鏡、レーザー光源を用いた読取装置、表面プラズモン共鳴 (SPR) イメージング、電気信号、化学的または生化学的マーカーのいずれかあるいは複数種を用いる手段、放射光、共焦点顕微鏡、非共焦点顕微鏡、微分干渉顕微鏡、実体顕微鏡、ビデオモニターおよび赤外線カメラからなる群より選択される少なくともひとつの手段を含む、項目 93 に記載のシステム。

【0109】

(97) 上記データを提示する手段は、ディスプレイである、項目 93 に記載のシステム。

## 【0110】

(98) 上記データを提示する手段は、スピーカである、項目93に記載のシステム。

## 【0111】

(99) 細胞の状態を判定するシステムであって、

- a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体；
  - b) 上記細胞上または上記細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターする手段；
  - c) 上記モニター手段から得られた信号からデータを生成する手段；および
  - d) 上記データから上記細胞の状態を外挿する手段、
- を備える、システム。

## 【0112】

(100) 外来因子と、上記外来因子に対する細胞の応答とを相関付けるシステムであって、

- a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体；
  - b) 外来因子を曝露する手段；
  - c) 上記細胞上または上記細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターする手段；
  - d) 上記モニター手段からの信号から、上記細胞のプロファイルのデータを生成する工程；および
  - e) 上記外来因子と、上記プロファイルとを相関付ける手段；
- を備える、システム。

## 【0113】

(101) 細胞のプロファイルから、細胞に与えられた未同定の外来因子を同定するためのシステムであって、

- a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体；
- b) 既知の外来因子を曝露する手段；
- c) 上記細胞上または上記細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターする手段；



- d) 外来因子の各々に対する上記細胞のプロファイルを得て上記細胞のプロファイルのデータを生成する手段；
- e) 上記既知の外来因子の各々と、上記プロファイルの各々とを相関付ける手段；
- f) 上記細胞を未同定の外来因子に曝露する手段；
- g) 上記手段（d）で得られた既知の外来因子のプロファイルと、未知の外来因子のプロファイルとを比較し、既知の外来因子のプロファイルの中から、未知の外来因子のプロファイルに対応するプロファイルを決断する手段であって、上記決断された未同定の外来因子は、上記決断されたプロファイルに対応する上記既知の外来因子である、手段、  
を備える、システム。

#### 【0114】

- （102） 細胞のプロファイルから、細胞に与えられた未同定の外来因子を同定するためのシステムであって、
- a) 上記細胞上または上記細胞内の生物学的因子またはその集合体に関し、既知の外来因子と、上記既知の外来因子に対応する上記細胞のプロファイルとの相関関係に関するデータが格納された記録媒体；
  - b) 上記細胞を未同定の外来因子に曝露する手段；
  - c) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体；
  - d) 上記細胞上または上記細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターする手段；
  - e) 上記モニター手段から得られた信号から、上記細胞のプロファイルを得る手段；
  - f) 上記記録媒体（a）において格納される上記プロファイルの中から、未知の外来因子に関して得られたプロファイルに対応するプロファイルを決断する手段であって、上記未同定の外来因子は、上記決断されたプロファイルに対応する上記既知の外来因子である、手段、  
を備える、システム。

**【0115】**

(103) 複数の細胞を固定し得、かつ、上記細胞の環境を同一に維持し得る支持体。

**【0116】**

(104) 上記支持体上の細胞は、アレイ状に配置され得る、項目103に記載の支持体。

**【0117】**

(105) 塩および正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体、またはアクチン作用物質を含む、項目103に記載の支持体。

**【0118】**

(106) 塩および正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体、ならびにアクチン作用物質を含む、項目103に記載の支持体。

**【0119】**

(107) 上記細胞は、最大1mm以下の間隔で配置され得る、項目103に記載の支持体。

**【0120】**

(108) 固定された細胞をさらに含む、項目103に記載の支持体。

**【0121】**

(109) 固定された生物学的因子をさらに含む、項目104に記載の支持体。

**【0122】**

(110) 上記生物学的因子は2種類以上固定される、項目109に記載の支持体。

**【0123】**

(111) 細胞および生物学的因子が固定される、項目103に記載の支持体。

**【0124】**

(112) 塩および正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体と、アクチン作用物質とが、細胞および生物学的因子とともに固定される、項目103

に記載の支持体。

【0125】

(113) 塩および正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体と、アクチン作用物質とが、細胞および生物学的因子とともにアレイ状に固定される、項目103に記載の支持体。

【0126】

(114) 塩と、遺伝子導入試薬と、アクチン作用物質と、核酸分子と、細胞とがアレイ状に固定される、項目104に記載の支持体。

【0127】

(115) 上記塩は、塩化カルシウム、リン酸水素ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、ピルビン酸ナトリウム、HEPES、塩化カルシウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫化マグネシウム、硝酸鉄、アミノ酸およびビタミンからなる群より選択される塩を含む、項目114に記載の支持体。

【0128】

(116) 上記遺伝子導入試薬は、カチオン性高分子、カチオン性脂質、ポリアミン系試薬、ポリイミン系試薬、リン酸カルシウム、オリゴフェクタミンおよびオリゴフェクターからなる群より選択される少なくともひとつの試薬を含む、項目114に記載の支持体。

【0129】

(117) 上記アクチン作用物質は、フィブロネクチン、ラミニンおよびビトロネクチンからなる群より選択される少なくとも1つのタンパク質またはその改変体もしくはフラグメントを含む、項目114に記載の支持体。

【0130】

(118) 上記核酸分子は、サイトカイン、ホルモン、細胞接着因子、細胞骨格タンパク質および酵素からなる群より選択されるタンパク質をコードする配列を含む、項目114に記載の支持体。

【0131】

(119) 上記細胞は、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、細菌細胞および真菌細胞からなる群より選択される細胞を含む、項目114に記載の支持体。

**【0132】**

(120) 上記支持体の材料は、ガラス、シリカ、およびプラスチックからなる群より選択される材料を含む、項目114に記載の支持体。

**【0133】**

(121) 固定された複数の細胞を含み、かつ、上記細胞の環境を同一に維持し得る支持体を生産する方法であって、

A) 支持体を提供する工程；および

B) 細胞を塩および正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体を用いて上記支持体上に固定する工程、を含む、方法。

**【0134】**

(122) 上記固定工程は、上記塩と、上記正に荷電した物質としての遺伝子導入試薬と、アクチン作用物質と、上記負に荷電した物質としての核酸分子と、上記細胞との混合物を、アレイ状に固定することを含む、項目121に記載の方法。

**【0135】**

(123) 上記固定工程は、プリント工程を含む、項目121に記載の方法。

**【0136】**

(124) 上記支持体の提供は、支持体材料から上記支持体を作製する工程を包含する、項目121に記載の方法、。

**【0137】**

(125) 固定された複数の細胞を含み、かつ、上記細胞の環境を同一に維持し得る支持体を生産する装置であって、

A) 支持体を提供する手段；および

B) 細胞を塩および正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体を用いて上記支持体上に固定する手段を備える、装置。

**【0138】**

(126) 上記固定手段は、プリント手段を含む、項目125に記載の装置

。

#### 【0139】

(127) 上記支持体提供手段は、支持体材料から上記支持体を成型する手段を含む、項目125に記載の装置。

#### 【0140】

本発明の他の実施形態、好ましい形態は、添付の図面を参酌しながら、本明細書の好ましい実施形態を理解することによって達成され得ることが認識され得る

。

#### 【0141】

##### 【発明の実施の形態】

以下、本発明を説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。従って、単数形の冠詞または形容詞（例えば、英語の場合は「a」、「an」、「the」など）は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。したがって、他に定義されない限り、本明細書中で使用される全ての専門用語および科学技術用語は、本発明の属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾する場合、本明細書（定義を含めて）が優先する。

#### 【0142】

##### （用語の定義）

以下に本明細書において特に使用される用語の定義を列挙する。

#### 【0143】

##### （細胞生物学）

本明細書において使用される「細胞」は、当該分野において用いられる最も広義の意味と同様に定義され、多細胞生物の組織の構成単位であって、外界を隔離する膜構造に包まれ、内部に自己再生能を備え、遺伝情報およびその発現機構を有する生命体をいう。本明細書において使用される細胞は、天然に存在する細胞

であっても、人工的に改変された細胞（例えば、融合細胞、遺伝子改変細胞）であってもよい。細胞の供給源としては、例えば、単一の細胞培養物であり得、あるいは、正常に成長したトランスジェニック動物の胚、血液、または体組織、または正常に成長した細胞株由来の細胞のような細胞混合物が挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0144】

本発明で用いられる細胞は、どの生物由来の細胞（たとえば、任意の種類の単細胞生物（例えば、細菌、酵母）または多細胞生物（例えば、動物（たとえば、脊椎動物、無脊椎動物）、植物（たとえば、単子葉植物、双子葉植物など）など））でもよい。例えば、脊椎動物（たとえば、メクラウナギ類、ヤツメウナギ類、軟骨魚類、硬骨魚類、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳動物など）由来の細胞が用いられ、より詳細には、哺乳動物（例えば、単孔類、有袋類、貧歯類、皮翼類、翼手類、食肉類、食虫類、長鼻類、奇蹄類、偶蹄類、管歯類、有鱗類、海牛類、クジラ目、霊長類、齧歯類、ウサギ目など）由来の細胞が用いられる。1つの実施形態では、霊長類（たとえば、チンパンジー、ニホンザル、ヒト）由来の細胞、特にヒト由来の細胞が用いられるがそれらに限定されない。本発明において用いられる細胞は、上記細胞は、幹細胞であってもよく体細胞であってもよい。また、そのような細胞は、付着細胞、浮遊細胞、組織形成細胞およびそれらの混合物などであり得る。そのような細胞は、移植目的に使用されるものであってもよい。

#### 【0145】

本発明において、臓器が対象とされる場合、そのような臓器はどのような臓器でもよく、また本発明が対象とする組織または細胞は、生物のどの臓器または器官に由来するものでもよい。本明細書において「臓器」または「器官」とは、互換可能に用いられ、生物個体のある機能が個体内の特定の部分に局在して営まれ、かつその部分が形態的に独立性をもっている構造体をいう。一般に多細胞生物（例えば、動物、植物）では器官は特定の空間的配置をもついくつかの組織からなり、組織は多数の細胞からなる。そのような臓器または器官としては、血管系に関連する臓器または器官が挙げられる。1つの実施形態では、本発明が対象と

する臓器は、皮膚、血管、角膜、腎臓、心臓、肝臓、臍帯、腸、神経、肺、胎盤、脾臓、脳、四肢末梢、網膜などが挙げられるがそれらに限定されない。本明細書において、本発明の多能性細胞から分化した細胞としては、表皮細胞、脾実質細胞、脾管細胞、肝細胞、血液細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、骨芽細胞、骨格筋芽細胞、神経細胞、血管内皮細胞、色素細胞、平滑筋細胞、脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞などが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0146】

本明細書において「組織」(tissue)とは、多細胞生物において、実質的に同一の機能および／または形態をもつ細胞集団をいう。通常「組織」は、同じ起源を有するが、異なる起源を持つ細胞集団であっても、同一の機能および／または形態を有するのであれば、組織と呼ばれ得る。従って、本発明の幹細胞を用いて組織を再生する場合、2以上の異なる起源を有する細胞集団が一つの組織を構成し得る。通常、組織は、臓器の一部を構成する。動物の組織は、形態的、機能的または発生的根拠に基づき、上皮組織、結合組織、筋肉組織、神経組織などに区別される。植物では、構成細胞の発達段階によって分裂組織と永久組織とに大別され、また構成細胞の種類によって単一組織と複合組織とに分けるなど、いろいろな分類が行われている。

#### 【0147】

本明細書において「幹細胞」とは、自己複製能を有し、多分化能（すなわち多能性）（「pluripotency」）を有する細胞をいう。幹細胞は通常、組織が傷害を受けたときにその組織を再生することができる。本明細書では幹細胞は、胚性幹（ES）細胞または組織幹細胞（組織性幹細胞、組織特異的幹細胞または体性幹細胞ともいう）であり得るがそれらに限定されない。また、上述の能力を有している限り、人工的に作製した細胞（たとえば、本明細書において記載される融合細胞、再プログラム化された細胞など）もまた、幹細胞であり得る。胚性幹細胞とは初期胚に由来する多能性幹細胞をいう。胚性幹細胞は、1981年に初めて樹立され、1989年以降ノックアウトマウス作製にも応用されている。1998年にはヒト胚性幹細胞が樹立されており、再生医学にも利用されつつある。組織幹細胞は、胚性幹細胞とは異なり、分化の方向が限定されている

細胞であり、組織中の特定の位置に存在し、未分化な細胞内構造をしている。従って、組織幹細胞は多能性のレベルが低い。組織幹細胞は、核／細胞質比が高く、細胞内小器官が乏しい。組織幹細胞は、概して、多分化能を有し、細胞周期が遅く、個体の一生以上に増殖能を維持する。本明細書において使用される場合は、幹細胞は胚性幹細胞であっても、組織幹細胞であってもよい。

#### 【0148】

由来する部位により分類すると、組織幹細胞は、例えば、皮膚系、消化器系、骨髄系、神経系などに分けられる。皮膚系の組織幹細胞としては、表皮幹細胞、毛嚢幹細胞などが挙げられる。消化器系の組織幹細胞としては、膵（共通）幹細胞、肝幹細胞などが挙げられる。骨髄系の組織幹細胞としては、造血幹細胞、間葉系幹細胞などが挙げられる。神経系の組織幹細胞としては、神経幹細胞、網膜幹細胞などが挙げられる。

#### 【0149】

本明細書において「体細胞」とは、卵子、精子などの生殖細胞以外の細胞であり、そのDNAを次世代に直接引き渡さない全ての細胞をいう。体細胞は通常、多能性が限定されているかまたは消失している。本明細書において使用される体細胞は、天然に存在するものであってもよく、遺伝子改変されたものであってもよい。

#### 【0150】

細胞は、由来により、外胚葉、中胚葉および内胚葉に由来する幹細胞に分類され得る。外胚葉由来の細胞は、主に脳に存在し、神経幹細胞などが含まれる。中胚葉由来の細胞は、主に骨髄に存在し、血管幹細胞、造血幹細胞および間葉系幹細胞などが含まれる。内胚葉由来の細胞は主に臓器に存在し、肝幹細胞、膵幹細胞などが含まれる。本明細書では、体細胞はどのような胚葉由来でもよい。好ましくは、体細胞は、リンパ球、脾臓細胞または精巣由来の細胞が使用され得る。

#### 【0151】

本明細書において「単離された」とは、通常環境において天然に付随する物質が少なくとも低減されていること、好ましくは実質的に含まないをいう。従って、単離された細胞とは、天然環境において付随する他の物質（たとえば、他



の細胞、タンパク質、核酸分子など) を実質的に含まない細胞をいう。核酸分子またはポリペプチドについていう場合、「単離された」とは、たとえば、組換え DNA 技術により作製された場合には細胞物質または培養培地を実質的に含まず、化学合成された場合には前駆体化学物質またはその他の化学物質を実質的に含まない、核酸分子またはポリペプチドを指す。単離された核酸分子は、好ましくは、その核酸分子が由来する生物において天然に該核酸分子に隣接している (flanking) 配列 (即ち、該核酸の 5' 末端および 3' 末端に位置する配列) を含まない。

#### 【0152】

本明細書において、「樹立された」または「確立された」細胞とは、特定の性質 (例えば、多分化能) を維持し、かつ、細胞が培養条件下で安定に増殖し続けるようになった状態をいう。したがって、樹立された幹細胞は、多分化能を維持する。

#### 【0153】

本明細書において「分化 (した) 細胞」とは、機能および形態が特殊化した細胞 (例えば、筋細胞、神経細胞など) をいい、幹細胞とは異なり、多能性はないか、またはほとんどない。分化した細胞としては、例えば、表皮細胞、脾実質細胞、脾管細胞、肝細胞、血液細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、骨芽細胞、骨格筋芽細胞、神経細胞、血管内皮細胞、色素細胞、平滑筋細胞、脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞などが挙げられる。

#### 【0154】

本明細書において細胞の「状態」とは、細胞の種々のパラメータ (例えば、細胞周期、外来因子に対する応答、シグナル伝達、遺伝子発現、遺伝子の転写など) に関する状況をさす。そのような状態としては、例えば、分化状態、未分化状態、外来因子に対する細胞応答、細胞周期、増殖状態などが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0155】

本明細書において、「分化」または「細胞分化」とは、1 個の細胞の分裂によって由来した娘細胞集団の中で形態的および／または機能的に質的な差をもった

二つ以上のタイプの細胞が生じてくる現象をいう。従って、元来特別な特徴を検出できない細胞に由来する細胞集団（細胞系譜）が、特定のタンパク質の産生などはっきりした特徴を示すに至る過程も分化に包含される。現在では細胞分化を、ゲノム中の特定の遺伝子群が発現した状態と考えることが一般的であり、このような遺伝子発現状態をもたらす細胞内あるいは細胞外の因子または条件を探索することにより細胞分化を同定することができる。細胞分化の結果は原則として安定であって、特に動物細胞では、別のタイプの細胞に分化することは例外的にしか起こらない。従って、本発明の S t m 遺伝子は、未分化細胞のマーカーとして非常に有用であり得る。

#### 【0156】

本明細書において「多能性」または「多分化能」とは、互換可能に用いられ、細胞の性質をいい、1以上、好ましくは2以上の種々の組織または臓器に分化し得る能力をいう。従って、「多能性」および「多分化能」は、本明細書においては特に言及しない限り「未分化」と互換可能に用いられる。通常、細胞の多能性は発生が進むにつれて制限され、成体では一つの組織または器官の構成細胞が別のものの細胞に変化することは少ない。従って多能性は通常失われている。とくに上皮性の細胞は他の上皮性細胞に変化しにくい。これが起きる場合通常病的な状態であり、化生 (m e t a p l a s i a) と呼ばれる。しかし間葉系細胞では比較的単純な刺激で他の間葉性細胞にかわり化生を起こしやすいので多能性の程度は高い。胚性幹細胞は、多能性を有する。組織幹細胞は、多能性を有する。本明細書において、多能性のうち、受精卵のように生体を構成する全ての種類の細胞に分化する能力は全能性といい、多能性は全能性の概念を包含し得る。ある細胞が多能性を有するかどうかは、たとえば、体外培養系における、胚様体 (E m b r y o i d B o d y) の形成、分化誘導条件下での培養等が挙げられるがそれらに限定されない。また、生体を用いた多能性の有無についてのアッセイ法としては、免疫不全マウスへの移植による奇形種 (テラトーマ) の形成、胚盤胞への注入によるキメラ胚の形成、生体組織への移植、腹水への注入による増殖等が挙げられるがそれらに限定されない。本明細書において、多能性のうち、受精卵のように生体を構成する全ての種類の細胞に分化する能力は「全能性」といい、

多能性は全能性の概念を包含し得る。また、1つの方向にのみ分化する能力は、単能性ともいう。

【0157】

(生化学・分子生物学)

本明細書において「因子」(agent)としては、意図する目的を達成することができる限りどのような物質または他の要素(例えば、光、放射能、熱、電気などのエネルギー)でもあってもよい。そのような物質としては、例えば、タンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチド、ペプチド、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、核酸(例えば、cDNA、ゲノムDNAのようなDNA、mRNAのようなRNAを含む)、ポリサッカリド、オリゴサッカリド、脂質、有機低分子(例えば、ホルモン、リガンド、情報伝達物質、有機低分子、コンビナトリアルケミストリで合成された分子、医薬品として利用され得る低分子(例えば、低分子リガンドなど)など)、これらの複合分子が挙げられるがそれらに限定されない。ポリヌクレオチドに対して特異的な因子としては、代表的には、そのポリヌクレオチドの配列に対して一定の配列相同性を(例えば、70%以上の配列同一性)もって相補性を有するポリヌクレオチド、プロモーター領域に結合する転写因子のようなポリペプチドなどが挙げられるがそれらに限定されない。ポリペプチドに対して特異的な因子としては、代表的には、そのポリペプチドに対して特異的に指向された抗体またはその誘導体あるいはその類似物(例えば、単鎖抗体)、そのポリペプチドがレセプターまたはリガンドである場合の特異的なリガンドまたはレセプター、そのポリペプチドが酵素である場合、その基質などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0158】

本明細書において「生物学的因子」とは、生命体(例えば、細胞)に関連する因子をいう。好ましくは、通常の状態に細胞に存在する因子を生物学的因子という。そのような生物学的因子としては、例えば、核酸分子、タンパク質、糖、脂肪、代謝物、低分子、それらの複合体など、ならびに時間的要素が入った因子などが挙げられるがそれらに限定されない。あるいは、生物学的因子としては、電流、電位(例えば、膜電位など)、pH、浸透圧なども本発明に包含されること

が理解される。本明細書において有用な生物学的因子としては、例えば、転写制御配列（例えば、プロモーターなど）、構造遺伝子またはそれをコードする核酸分子挙げられる。「生物学的因子」の「集合体」とは、本明細書において使用される場合、複数の生物学的因子（同種または異種）をいう。好ましくは、協働している生物学的因子をさす。

#### 【0159】

本明細書において、「遺伝子」とは、遺伝形質を規定する因子をいう。通常染色体上に一定の順序に配列している。タンパク質の一次構造を規定するものを構造遺伝子といい、その発現を左右するものを調節遺伝子（たとえば、プロモーター）という。本明細書では、遺伝子は、特に言及しない限り、構造遺伝子および調節遺伝子を包含する。近年では、ゲノムが解析され、配列自体はすべて判明している。その機能は必ずしも判明しているわけではないが、タンパク質もRNAもコードしない配列も存在する。そのような配列もまた、遺伝形質に影響を有していることが充分理解され、したがって、そのような配列もまた、本明細書の最も広義な定義においては遺伝子の概念に入ることが理解される。したがって、例えば、サイクリン遺伝子というときは、通常、サイクリンの構造遺伝子およびサイクリンのプロモーターの両方を包含する。本明細書では、「遺伝子」は、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「核酸分子」および「核酸」ならびに／または「タンパク質」、「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」および「ペプチド」を指すことがある。本明細書においてはまた、「遺伝子産物」は、遺伝子によって発現された「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「核酸分子」および「核酸」ならびに／または「タンパク質」、「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」および「ペプチド」を包含する。当業者であれば、遺伝子産物が何たるかはその状況に応じて理解することができる。

#### 【0160】

本明細書において配列（例えば、核酸配列、アミノ酸配列など）の「相同性」とは、2以上の遺伝子配列の、互いに対する同一性の程度をいう。従って、ある2つの遺伝子の相同性が高いほど、それらの配列の同一性または類似性は高い。2種類の遺伝子が相同性を有するか否かは、配列の直接の比較、または核酸の場

合ストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーション法によって調べられ得る。2つの遺伝子配列を直接比較する場合、その遺伝子配列間でDNA配列が、代表的には少なくとも50%同一である場合、好ましくは少なくとも70%同一である場合、より好ましくは少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一である場合、それらの遺伝子は相同性を有する。本明細書において、配列（例えば、核酸配列、アミノ酸配列など）の「類似性」とは、上記相同性において、保存的置換をポジティブ（同一）とみなした場合の、2以上の遺伝子配列の、互いに対する同一性の程度をいう。従って、保存的置換がある場合は、その保存的置換の存在に応じて同一性と類似性とは異なる。また、保存的置換がない場合は、同一性と類似性とは同じ数値を示す。

#### 【0161】

本明細書では、アミノ酸配列および塩基配列の類似性、同一性および相同性の比較は、配列分析用ツールであるFASTAを用いてデフォルトパラメータを用いて算出される。

#### 【0162】

本明細書において使用される用語「タンパク質」、「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」および「ペプチド」は、本明細書において同じ意味で使用され、任意の長さのアミノ酸のポリマーをいう。このポリマーは、直鎖であっても分岐していてもよく、環状であってもよい。アミノ酸は、天然のものであっても非天然のものであってもよく、改変されたアミノ酸であってもよい。この用語はまた、複数のポリペプチド鎖の複合体へとアセンブルされたものを包含し得る。この用語はまた、天然または人工的に改変されたアミノ酸ポリマーも包含する。そのような改変としては、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化または任意の他の操作もしくは改変（例えば、標識成分との結合体化）。この定義にはまた、例えば、アミノ酸の1または2以上のアナログを含むポリペプチド（例えば、非天然のアミノ酸などを含む）、ペプチド様化合物（例えば、ペプトイド）および当該分野において公知の他の改変が包含される。フィブロネクチンのような細胞外マトリクスタンパク質の遺伝子産物は、通常ポリペプチド形態をとる。

## 【0163】

本明細書において使用される用語「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「核酸分子」および「核酸」は、本明細書において同じ意味で使用され、任意の長さのヌクレオチドのポリマーをいう。この用語はまた、「誘導体オリゴヌクレオチド」または「誘導体ポリヌクレオチド」を含む。「誘導体オリゴヌクレオチド」または「誘導体ポリヌクレオチド」とは、ヌクレオチドの誘導体を含むか、またはヌクレオチド間の結合が通常とは異なるオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドをいい、互換的に使用される。そのようなオリゴヌクレオチドとして具体的には、例えば、2'-O-メチル-リボヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'-P5' ホスホロアミデート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合とがペプチド核酸結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5 プロピニルウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5 チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5 プロピニルシトシンで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換された誘導体オリゴヌクレオチド、DNA中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドなどが例示される。他にそうではないと示されなければ、特定の核酸配列はまた、明示的に示された配列と同様に、その保存的に改変された改変体 (例えば、縮重コドン置換体) および相補配列を包含することが企図される。具体的には、縮重コドン置換体は、1またはそれ以上の選択された (または、すべての) コドンの3番目の位置が混合塩基および/またはデオキシイノシン残基で置換された配列を作成することにより達成され得る (Batzera, Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsukaら、

J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); Rossoliniら、Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994) )。フィブロネクチンのような細胞外マトリクスタンパク質などの遺伝子は、通常、このポリヌクレオチド形態をとる。また、トランスフェクションの対象となる分子もこのポリヌクレオチドである。

#### 【0164】

本明細書において、「対応する」アミノ酸または核酸とは、それぞれあるポリペプチド分子またはポリヌクレオチド分子において、比較の基準となるポリペプチドまたはポリヌクレオチドにおける所定のアミノ酸と同様の作用を有するか、あるいは有することが予測されるアミノ酸または核酸をいい、特に酵素分子にあつては、活性部位中の同様の位置に存在し触媒活性に同様の寄与をするアミノ酸をいう。例えば、あるポリヌクレオチドの転写制御配列であれば、その転写制御配列の特定の部分に対応するオルソログにおける同様の部分であり得る。

#### 【0165】

本明細書において、「対応する」遺伝子（例えば、ポリペプチドまたは核酸分子）とは、ある種において、比較の基準となる種における所定の遺伝子と同様の作用を有するか、または有することが予測される遺伝子をいい、そのような作用を有する遺伝子が複数存在する場合、進化学的に同じ起源を有するものをいう。従って、ある遺伝子の対応する遺伝子は、その遺伝子のオルソログあるいは種相同体であり得る。したがって、マウスサイクリン遺伝子に対応する遺伝子は、他の動物においても見出すことができる。そのような対応する遺伝子は、当該分野において周知の技術を用いて同定することができる。したがって、例えば、ある動物における対応する遺伝子は、対応する遺伝子の基準となる遺伝子（例えば、マウスサイクリン遺伝子）の配列をクエリ配列として用いてその動物（例えばヒト、ラット）の配列データベースを検索することによって見出すことができる。

#### 【0166】

本明細書において、「フラグメント」とは、全長のポリペプチドまたはポリヌクレオチド（長さが $n$ ）に対して、 $1 \sim n-1$ までの配列長さを有するポリペプチドまたはポリヌクレオチドをいう。フラグメントの長さは、その目的に応じて

、適宜変更することができ、例えば、その長さの下限としては、ポリペプチドの場合、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50およびそれ以上のアミノ酸が挙げられ、ここの具体的に列挙していない整数で表される長さ（例えば、11など）もまた、下限として適切であり得る。また、ポリヌクレオチドの場合、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、75、100およびそれ以上のヌクレオチドが挙げられ、ここの具体的に列挙していない整数で表される長さ（例えば、11など）もまた、下限として適切であり得る。本明細書において、ポリペプチドおよびポリヌクレオチドの長さは、上述のようにそれぞれアミノ酸または核酸の個数で表すことができるが、上述の個数は絶対的なものではなく、同じ機能を有する限り、上限または加減としての上述の個数は、その個数の上下数個（または例えば上下10%）のものも含むことが意図される。そのような意図を表現するために、本明細書では、個数の前に「約」を付けて表現することがある。しかし、本明細書では、「約」のあるなしはその数値の解釈に影響を与えないことが理解されるべきである。

#### 【0167】

本明細書において「生物学的活性」とは、ある因子（例えば、ポリペプチドまたは核酸分子など）が、生体内において有し得る活性のことをいい、種々の機能（例えば、転写促進活性）を発揮する活性が包含される。例えば、ある因子がアンチセンス分子である場合、その生物学的活性は、対象となる核酸分子への結合、それによる発現抑制などを包含する。例えば、ある因子が酵素である場合、その生物学的活性は、その酵素活性を包含する。別の例では、ある因子がリガンドである場合、そのリガンドが対応するレセプターへの結合を包含する。その生物学的活性が転写調節活性である場合は、転写レベルまたはその変動を調節する活性をいう。そのような生物学的活性は、当該分野において周知の技術によって測定することができる。

#### 【0168】

本明細書において、「ストリンジेंटな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド」とは、当該分野で慣用される周知の条件をいう。本発明のポリヌクレオチド中から選択されたポリヌクレオチドをプローブとして、コロニー・ハイブ



リダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより、そのようなポリヌクレオチドを得ることができる。具体的には、コロニーあるいはブランク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍濃度のSSC (s a l i n e - s o d i u m c i t r a t e) 溶液 (1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM 塩化ナトリウム、15mM クエン酸ナトリウムである) を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるポリヌクレオチドを意味する。ハイブリダイゼーションは、M o l e c u l a r C l o n i n g 2 n d e d . , C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y , S u p p l e m e n t 1 ~ 3 8 , D N A C l o n i n g 1 : C o r e T e c h n i q u e s , A P r a c t i c a l A p p r o a c h , S e c o n d E d i t i o n , O x f o r d U n i v e r s i t y P r e s s ( 1 9 9 5 ) 等の実験書に記載されている方法に準じて行うことができる。ここで、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列からは、好ましくは、A配列のみまたはT配列のみを含む配列が除外される。「ハイブリダイズ可能なポリヌクレオチド」とは、上記ハイブリダイズ条件下で別のポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドをいう。ハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドとして具体的には、本発明で具体的に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAの塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するポリヌクレオチド、好ましくは80%以上の相同性を有するポリヌクレオチド、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するポリヌクレオチドを挙げることができる。

#### 【0169】

本明細書において「塩」は、当該分野において通常用いられる最も広い意味と同じ意味で用いられ、無機塩および有機塩の両方を含む。塩は、通常、酸と塩基との中和反応によって生成する。塩には中和反応で生成するNaCl、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>などといったもののほかに、金属と酸との反応で生成するPbSO<sub>4</sub>、ZnCl<sub>2</sub>など種々の種類があり、これらは、直接中和反応によって生成したものではなくて

も、酸と塩基との中和反応から生成したとみなすことができる。塩としては、正塩（酸のHや塩基のOHが塩に含まれていないもの、例えば、 $\text{NaCl}$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、 $\text{CH}_3\text{COONa}$ 、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ）、酸性塩（酸のHが塩に残っているもの、例えば、 $\text{NaHCO}_3$ 、 $\text{KHSO}_4$ 、 $\text{CaHPO}_4$ ）、塩基性塩（塩基のOHが塩の中に残っているもの、例えば、 $\text{MgCl}(\text{OH})$ 、 $\text{CuCl}(\text{OH})$ ）などに分類することができるがそれらの分類は、本発明においてはそれほど重要ではない。好ましい塩としては、培地を構成する塩（例えば、塩化カルシウム、リン酸水素ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、ピルビン酸ナトリウム、HEPES、塩化カルシウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫化マグネシウム、硝酸鉄、アミノ酸、ビタミン、緩衝液を構成する塩（例えば、塩化カルウム、塩化マグネシウム、リン酸水素ナトリウム、塩化ナトリウム）などが好ましい。細胞に対する親和性を保持または改善する効果がより高いからである。これらの塩は、単独で用いてもよいし、複数用いてもよい。複数用いることが好ましい。細胞に対する親和性が高くなる傾向があるからである。従って、 $\text{NaCl}$ などを単独で用いるよりも、培地中に含まれる塩（例えば、塩化カルウム、塩化マグネシウム、リン酸水素ナトリウム、塩化ナトリウム）を複数を用いることが好ましく、より好ましくは、培地中に含まれる塩全部をそのまま使用することが有利であり得る。別の好ましい実施形態では、グルコースを加えてもよい。

#### 【0170】

本明細書において使用される用語「物質」は、当該分野において用いられる最も広義な意味と同じ意味で含まれ、正または負に荷電することができるものを含む。

#### 【0171】

本明細書において「正に荷電した物質」は、正荷電を有するすべての物質を包含する。そのような物質としては、例えば、カチオン性ポリマー、カチオン性脂質などのカチオン性物質が含まれるがそれらに限定されない。好ましくは、そのような正に荷電した物質は、複合体を形成することができる物質であることが有利である。そのような複合体を形成することができる正に荷電した物質としては、例えば、カチオン性ポリマーのようにある程度の分子量を有する物質、あるい

は、カチオン性脂質のように特定の溶媒（例えば、水、水溶液など）中においてある程度溶解せずに残存することができる物質などが挙げられるがそれらに限定されない。そのような好ましい正に荷電した物質としては、例えば、ポリエチレンイミン、ポリリシン、合成ポリペプチドもしくはそれらの誘導体などが挙げられるがそれらに限定されない。あるいは、正に荷電した物質としては、ヒストン、合成ポリペプチドなどのような生体分子が挙げられるがそれらに限定されない。そのような好ましい正に荷電した物質の種類は、複合体を形成するパートナーである負に荷電した物質の種類に応じて変動する。好ましい複合体形成パートナーを選択することは、当業者には容易であり、そのような選択は、当該分野において周知の技術を用いて行うことができる。そのような好ましい複合体形成パートナーの選択においては、種々のパラメータを考慮することができる。そのようなパラメータとしては、例えば、電荷、分子量、疎水性、親水性、置換基の性質、pH、温度、塩濃度、圧力などの種々の物理的パラメータ、化学的パラメータなどが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0172】

本明細書において「カチオン性ポリマー」は、カチオン性の官能基を有するポリマーをいい、例えば、ポリエチレンイミン、ポリリシン、合成ポリペプチドもしくはそれらの誘導体が挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0173】

本明細書において「カチオン性脂質」は、カチオン性の官能基を有する脂質をいい、例えば、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、及びその誘導体が挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0174】

ここで、カチオン性の官能基としては、例えば、一級アミン、二級アミン、三級アミンが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0175】

本明細書において「負に荷電した物質」は、負荷電を有するすべての物質を包含する。そのような物質としては、例えば、DNAなどの生体分子ポリマー、アニオン性脂質などのアニオン性物質が含まれるがそれらに限定されない。好まし

くは、そのような負に荷電した物質は、複合体を形成することができる物質であることが有利である。そのような複合体を形成することができる負に荷電した物質としては、例えば、DNAのようなアニオン性ポリマーのようにある程度の分子量を有する物質、あるいは、アニオン性脂質のように特定の溶媒（例えば、水、水溶液など）中においてある程度溶解せずに残存することができる物質などが挙げられるがそれらに限定されない。そのような好ましい負に荷電した物質としては、例えば、DNA、RNA、PNA、ポリペプチド、化学化合物、及びその複合体などが挙げられるがそれらに限定されない。あるいは、負に荷電した物質としては、DNA、RNA、PNA、ポリペプチド、化学化合物、及びその複合体などのような生物学的因子または生体分子が挙げられるがそれらに限定されない。そのような好ましい負に荷電した物質の種類は、複合体を形成するパートナーである正に荷電した物質の種類に応じて変動する。好ましい複合体形成パートナーを選択することは、当業者には容易であり、そのような選択は、当該分野において周知の技術を用いて行うことができる。そのような好ましい複合体形成パートナーの選択においては、種々のパラメータを考慮することができる。そのようなパラメータもまた、上述の正に荷電した物質において考慮すべきパラメータと同様、種々のものを包含する。

#### 【0176】

本明細書において「アニオン性ポリマー」は、アニオン性の官能基を有するポリマーをいい、例えば、DNA、RNA、PNA、ポリペプチド、化学化合物、及びその複合体が挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0177】

本明細書において「アニオン性脂質」は、アニオン性の官能基を有する脂質をいい、例えば、ホスファチジン酸、ホスファチジルセリンが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0178】

ここで、アニオン性の官能基としては、例えば、カルボキシル基、リン酸基が挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0179】

また、目的の物質に対して、正電荷または負電荷を有する置換基などの部分を付加することによって、その目的の物質の電荷を変換することも可能である。好ましい複合体パートナーが固定を目的とする物質と同じ電荷を有している場合に、いずれかの電荷を変換することによって複合体形成を促進することが可能である。

#### 【0180】

本明細書において「複合体」とは、二つ以上の物質が互いに直接的または間接的に相互作用する結果、それらの物質の総体があたかも1つの物質のように挙動するものをいう。

#### 【0181】

本明細書において「複合体パートナー」とは、複合体を形成するあるメンバーについて言及するとき、そのメンバーと直接的または間接的に相互作用する別のメンバーをいう。

#### 【0182】

本明細書において複合体を形成する条件は、複合体パートナーの種類に応じて変動する。そのような条件は、当業者は容易に理解することができ、当該分野において周知の技法を用いて任意の複合体パートナー（例えば、正に荷電した物質および負に荷電した物質）から複合体を形成させることができる。

#### 【0183】

本明細書において、正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体が使用される時、そのいずれかまたは両方は、生物学的因子と同一であってもよい。

#### 【0184】

本明細書において「固定」とは、固相支持体について用いられるとき、その対象となる物質（例えば、生体分子）がその支持体において少なくともある一定の時間の間保持される状態またはそのような状態にさせることをいう。従って、物質が固相支持体上で固定された後、条件が変化する（例えば、別の溶媒中に浸される）場合は、その固定状態が解除されてもよい。

#### 【0185】

本明細書において用いられる「細胞親和性」とは、ある物質が細胞（例えば、

細菌細胞、動物細胞、酵母、植物細胞など）または細胞を含む物体（例えば、組織、臓器、生体など）と相互作用が可能な状態に置かれたときに、その細胞または細胞を含む物体に対して有害な影響を与えない性質をいう。好ましくは、細胞親和性を有する物質は、細胞が優先的に相互作用する物質であり得るがそれに限定されない。本発明では、固定されるべき物質（例えば、正に荷電した物質および／または負に荷電した物質）は、細胞親和性を有することが好ましいがそれに限定されない。固定されるべき物質が細胞親和性を有する場合、その物質が本発明にしたがって固定されると、細胞親和性が保持または改善されることが予想外に見いだされた。通常、細胞親和性を有する物質が固相支持体に固定される場合は、必ずしも細胞親和性が保持されるとは限らなかったことに鑑みると、本発明の効果は計り知れない。

#### 【0186】

本明細書において「プローブ」とは、インビトロおよび／またはインビボなどのスクリーニングなどの生物学的実験において用いられる、検索の対象となる物質をいい、例えば、特定の塩基配列を含む核酸分子または特定のアミノ酸配列を含むペプチドなどが挙げられるがそれに限定されない。

#### 【0187】

通常プローブとして用いられる核酸分子としては、目的とする遺伝子の核酸配列と相同なまたは相補的な、少なくとも8の連続するヌクレオチド長の核酸配列を有するものが挙げられる。そのような核酸配列は、好ましくは、少なくとも9の連続するヌクレオチド長の、より好ましくは10の連続するヌクレオチド長の、さらに好ましくは11の連続するヌクレオチド長の、12の連続するヌクレオチド長の、13の連続するヌクレオチド長の、14の連続するヌクレオチド長の、15の連続するヌクレオチド長の、20の連続するヌクレオチド長の、25の連続するヌクレオチド長の、30の連続するヌクレオチド長の、40の連続するヌクレオチド長の、50の連続するヌクレオチド長の、核酸配列であり得る。プローブとして使用される核酸配列には、上述の配列に対して、少なくとも70%相同な、より好ましくは、少なくとも80%相同な、さらに好ましくは、90%相同な、95%相同な核酸配列が含まれる。

## 【0188】

本明細書において、「検索」とは、電子的にまたは生物学的あるいは他の方法により、ある核酸塩基配列を利用して、特定の機能および／または性質を有する他の核酸塩基配列を見出すことをいう。電子的な検索としては、BLAST (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990))、FASTA (Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 85:2444-2448 (1988))、Smith and Waterman法 (Smith and Waterman, J. Mol. Biol. 147:195-197 (1981))、およびNeedleman and Wunsch法 (Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443-453 (1970))などが挙げられるがそれらに限定されない。生物学的な検索としては、ストリンジェントハイブリダイゼーション、ゲノムDNAをナイロンメンブレン等に貼り付けたマクロアレイまたはガラス板に貼り付けたマイクロアレイ (マイクロアレイアッセイ)、PCRおよび in situハイブリダイゼーションなどが挙げられるがそれらに限定されない。

## 【0189】

本明細書における「プライマー」とは、高分子合成酵素反応において、合成される高分子化合物の反応の開始に必要な物質をいう。核酸分子の合成反応では、合成されるべき高分子化合物の一部の配列に相補的な核酸分子 (例えば、DNAまたはRNAなど) が用いられ得る。

## 【0190】

通常プライマーとして用いられる核酸分子としては、目的とする遺伝子の核酸配列と相補的な、少なくとも8の連続するヌクレオチド長の核酸配列を有するものが挙げられる。そのような核酸配列は、好ましくは、少なくとも9の連続するヌクレオチド長の、より好ましくは10の連続するヌクレオチド長の、さらに好ましくは11の連続するヌクレオチド長の、12の連続するヌクレオチド長の、13の連続するヌクレオチド長の、14の連続するヌクレオチド長の、15の連続するヌクレオチド長の、16の連続するヌクレオチド長の、17の連続するヌク

レオチド長の、18の連続するヌクレオチド長の、19の連続するヌクレオチド長の、20の連続するヌクレオチド長の、25の連続するヌクレオチド長の、30の連続するヌクレオチド長の、40の連続するヌクレオチド長の、50の連続するヌクレオチド長の、核酸配列であり得る。プローブとして使用される核酸配列には、上述の配列に対して、少なくとも70%相同な、より好ましくは、少なくとも80%相同な、さらに好ましくは、90%相同な、95%相同な核酸配列が含まれる。プライマーとして適切な配列は、合成（増幅）が意図される配列の性質によって変動し得るが、当業者は、意図される配列に応じて適宜プライマーを設計することができる。そのようなプライマーの設計は当該分野において周知であり、手動でおこなってもよくコンピュータプログラム（例えば、LASER GENE, Primer Select, DNASTar）を用いて行ってもよい。

#### 【0191】

本明細書において、「エピトープ」とは、構造の明らかな抗原決定基をいう。従って、エピトープには特定の免疫グロブリンによる認識に関与するアミノ酸残基のセット、または、T細胞の場合は、T細胞レセプタータンパク質および／もしくは主要組織適合性複合体（MHC）レセプターによる認識について必要であるアミノ酸残基のセットが含まれる。この用語はまた、「抗原決定基」または「抗原決定部位」と交換可能に使用される。免疫系分野において、インビボまたはインビトロで、エピトープは、分子の特徴（例えば、一次ペプチド構造、二次ペプチド構造または三次ペプチド構造および電荷）であり、免疫グロブリン、T細胞レセプターまたはHLA分子によって認識される部位を形成する。ペプチドを含むエピトープは、エピトープに独特な空間的コンフォメーション中に3つ以上のアミノ酸を含み得る。一般に、エピトープは、少なくとも5つのこのようなアミノ酸からなり、代表的には少なくとも6つ、7つ、8つ、9つ、または10のこのようなアミノ酸からなる。エピトープの長さは、より長いほど、もとのペプチドの抗原性に類似することから一般的に好ましいが、コンフォメーションを考慮すると、必ずしもそうでないことがある。アミノ酸の空間的コンフォメーションを決定する方法は、当該分野で公知であり、例えば、X線結晶学、および2



次元核磁気共鳴分光法を含む。さらに、所定のタンパク質におけるエピトープの同定は、当該分野で周知の技術を使用して容易に達成される。例えば、Geysenら(1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998 (所定の抗原における免疫原性エピトープの位置を決定するために迅速にペプチドを合成する一般的な方法)；米国特許第4,708,871号(抗原のエピトープを同定し、そして化学的に合成するための手順)；およびGeysenら(1986) Molecular Immunology 23:709 (所定の抗体に対して高い親和性を有するペプチドを同定するための技術)を参照されたい。同じエピトープを認識する抗体は、単純な免疫アッセイにおいて同定され得る。このように、ペプチドを含むエピトープを決定する方法は、当該分野において周知であり、そのようなエピトープは、核酸またはアミノ酸の一次配列が提供されると、当業者はそのような周知慣用技術を用いて決定することができる。

#### 【0192】

従って、ペプチドを含むエピトープとして使用するためには、少なくとも3アミノ酸の長さの配列が必要であり、好ましくは、この配列は、少なくとも4アミノ酸、より好ましくは5アミノ酸、6アミノ酸、7アミノ酸、8アミノ酸、9アミノ酸、10アミノ酸、15アミノ酸、20アミノ酸、25アミノ酸の長さの配列が必要であり得る。

#### 【0193】

本明細書においてある核酸分子またはポリペプチドに「特異的に結合する因子」とは、その核酸分子またはポリペプチドに対するその因子の結合レベルが、その核酸分子またはポリペプチド以外の核酸分子またはポリペプチドに対するその因子の結合レベルと同じかまたはそれよりも高い因子をいう。そのような因子としては、例えば、対象が核酸分子の場合、対象となる核酸分子に対して相補的な配列を有する核酸分子、対象となる核酸配列に対して結合するポリペプチド(例えば、転写因子など)などが挙げられ、対象がポリペプチドの場合、抗体、単鎖抗体、レセプターーリガンドの対のいずれか一方、酵素ー基質のいずれか一方などが挙げられるがそれらに限定されない。

## 【0194】

本明細書において用いられる用語「抗体」は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、多重特異性抗体、キメラ抗体、および抗イディオタイプ抗体、ならびにそれらの断片、例えばF(a b')<sub>2</sub>およびF a b断片、ならびにその他の組換えにより生産された結合体を含む。さらにこのような抗体を、酵素、例えばアルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、αガラクトシダーゼなど、に共有結合させまたは組換えにより融合させてよい。

## 【0195】

本明細書中で使用される用語「モノクローナル抗体」は、同質な抗体集団を有する抗体組成物をいう。この用語は、それが作製される様式によって限定されない。この用語は、全免疫グロブリン分子ならびにF a b分子、F(a b')<sub>2</sub>フラグメント、F<sub>v</sub>フラグメント、およびもとのモノクローナル抗体分子の免疫学的結合特性を示す他の分子を含む。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を作製する方法は当該分野で公知であり、そして以下でより十分に記載される。

## 【0196】

モノクローナル抗体は、当該分野で周知の標準的な技術（例えば、KohlerおよびMilstein, Nature (1975) 256:495）またはその改変（例えば、Buckら (1982) In Vitro 18:377）を使用して調製される。代表的には、マウスまたはラットを、タンパク質キャリアに結合したタンパク質で免疫化し、追加免疫し、そして脾臓（および必要に応じていくつかの大きなリンパ節）を取り出し、そして単一細胞を解離する。必要に応じて、この脾臓細胞は、非特異的接着細胞の除去後、抗原でコーティングされたプレートまたはウェルに細胞懸濁液を適用することにより、スクリーニングされ得る。抗原に特異的なイムノグロブリンを発現するB細胞がプレートに結合し、そして懸濁液の残渣でもリンス除去されない。次いで、得られたB細胞（すなわちすべての剥離した脾臓細胞）をミエローマ細胞と融合させて、ハイブリドーマを得、このハイブリドーマを用いてモノクローナル抗体を産生させる。

## 【0197】

本明細書において「抗原」(antigen)とは、抗体分子によって特異的に結合され得る任意の基質をいう。本明細書において「免疫原」(immunogen)とは、抗原特異的免疫応答を生じるリンパ球活性化を開始し得る抗原をいう。

## 【0198】

あるタンパク質分子において、配列に含まれるあるアミノ酸は、相互作用結合能力の明らかな低下または消失なしに、例えば、カチオン性領域または基質分子の結合部位のようなタンパク質構造において他のアミノ酸に置換され得る。あるタンパク質の生物学的機能を規定するのは、タンパク質の相互作用能力および性質である。従って、特定のアミノ酸の置換がアミノ酸配列において、またはそのDNAコード配列のレベルにおいて行われ得、置換後もなお、もとの性質を維持するタンパク質が生じ得る。従って、生物学的有用性の明らかな損失なしに、種々の改変が、本明細書において開示されたペプチドまたはこのペプチドをコードする対応するDNAにおいて行われ得る。

## 【0199】

上記のような改変を設計する際に、アミノ酸の疎水性指数が考慮され得る。タンパク質における相互作用的な生物学的機能を与える際の疎水性アミノ酸指数の重要性は、一般に当該分野で認められている(Kyte, JおよびDoolittle, R. F. J. Mol. Biol. 157 (1) : 105-132, 1982)。アミノ酸の疎水的性質は、生成したタンパク質の二次構造に寄与し、次いでそのタンパク質と他の分子(例えば、酵素、基質、レセプター、DNA、抗体、抗原など)との相互作用を規定する。各アミノ酸は、それらの疎水性および電荷の性質に基づく疎水性指数を割り当てられる。それらは：イソロイシン(+4.5)；バリン(+4.2)；ロイシン(+3.8)；フェニルアラニン(+2.8)；システイン／シスチン(+2.5)；メチオニン(+1.9)；アラニン(+1.8)；グリシン(-0.4)；スレオニン(-0.7)；セリン(-0.8)；トリプトファン(-0.9)；チロシン(-1.3)；プロリン(-1.6)；ヒスチジン(-3.2)；グルタミン酸(-3.5)；グルタミン

(-3.5) ; アスパラギン酸 (-3.5) ; アスパラギン (-3.5) ; リジン (-3.9) ; およびアルギニン (-4.5) ) である。

#### 【0200】

あるアミノ酸を、同様の疎水性指数を有する他のアミノ酸により置換して、そして依然として同様の生物学的機能を有するタンパク質 (例えば、酵素活性において等価なタンパク質) を生じさせ得ることが当該分野で周知である。このようなアミノ酸置換において、疎水性指数が $\pm 2$ 以内であることが好ましく、 $\pm 1$ 以内であることがより好ましく、および $\pm 0.5$ 以内であることがさらに好ましい。疎水性に基づくこのようなアミノ酸の置換は効率的であることが当該分野において理解される。米国特許第4,554,101号に記載されるように、以下の親水性指数がアミノ酸残基に割り当てられている: アルギニン (+3.0) ; リジン (+3.0) ; アスパラギン酸 (+3.0 $\pm$ 1) ; グルタミン酸 (+3.0 $\pm$ 1) ; セリン (+0.3) ; アスパラギン (+0.2) ; グルタミン (+0.2) ; グリシン (0) ; スレオニン (-0.4) ; プロリン (-0.5 $\pm$ 1) ; アラニン (-0.5) ; ヒスチジン (-0.5) ; システイン (-1.0) ; メチオニン (-1.3) ; バリン (-1.5) ; ロイシン (-1.8) ; イソロイシン (-1.8) ; チロシン (-2.3) ; フェニルアラニン (-2.5) ; およびトリプトファン (-3.4)。アミノ酸が同様の親水性指数を有しかつ依然として生物学的等価体を与え得る別のものに置換され得ることが理解される。このようなアミノ酸置換において、親水性指数が $\pm 2$ 以内であることが好ましく、 $\pm 1$ 以内であることがより好ましく、および $\pm 0.5$ 以内であることがさらに好ましい。

#### 【0201】

(プロファイルおよび関連技術)

本明細書において、細胞に関する「プロファイル」とは、細胞の生物学的状態の測定の集合をいう。特に、細胞のプロファイルという場合は、プロファイルとは、「細胞構成要素」のレベルを定量的に測定したものの測定値の集合あるいは連続であり得る。細胞構成要素には、生物学的系における遺伝子発現レベル、転写レベル (転写制御配列の活性レベル)、特定の遺伝子をコードするmRNAの

存在量、およびタンパク質発現レベルが含まれる。遺伝子をコードする mRNA および／またはタンパク質発現レベルなどの細胞の各種構成要素のレベルは、薬物による処置や他の細胞生物学的状態の刺激 (p e r t u r b a t i o n) または振動に応答して変化することが知られている。したがって、複数のそのような「細胞構成要素」の測定は、細胞の生物学的状態に対する刺激の効果に関する情報を豊富に含むことから、このプロファイルは、細胞の分析および詳細な解析においてますます重要となっている。哺乳動物細胞においては3万以上の異なる細胞構成要素が存在する。個々の細胞のプロファイルは通常複雑である。生物学的系の所定の状態のプロファイルは、しばしば、その生物学的系が刺激に付された後で測定される。そのような刺激としては、生物学的系と関係した実験的または環境的状态があり、例えば、生物学的系の薬物候補への暴露、外因性遺伝子の導入、時間の経過、系からの遺伝子の欠失、または培養条件の変更などがある。細胞構成要素の広範囲にわたる測定、つまり細胞における遺伝子の複製または転写、およびタンパク質の発現ならびにそれらの刺激に対する応答のプロファイルは、細胞自体の調査に加えて、薬物の効果の比較および検討、疾病の診断、患者の投薬法の最適化を含めて、広範な有用性がある。さらに、それらは基本的なライフサイエンスの研究においても有用である。このようなプロファイルは、種々の形態でデータとして生成され、提示される。そのような形態としては、数字と時間との関数の形態、グラフ形態、画像形態などが挙げられるがそれらに限定されない。したがって、プロファイルに関するデータは、ときに、「プロファイルデータ」と本明細書において称することがある。このようなデータ生成は、コンピュータにより容易に達成され得る。適切なプログラムのコード化もまた当該分野において周知の技術で実施され得る。

### 【0202】

本発明の細胞分析では、細胞またはそれに相互作用する物質に起因する情報を検出することができる限り、種々の検出方法および検出手段を用いることができる。そのような検出方法および検出手段としては、例えば、目視、光学顕微鏡、蛍光顕微鏡、レーザー光源を用いた読取装置、表面プラズモン共鳴 (S P R) イメージング、電気信号、化学的または生化学的マーカーのいずれかあるいは複数

種を用いる方法および手段を挙げることができるがそれらに限定されない。

### 【0203】

本明細書において特に「経時プロファイル」というとき、ある特定の細胞に関して言及するとき、その細胞に関するあるパラメータの経時変化を示すプロファイルをいう。そのような経時プロファイルとしては、例えば、転写状態の経時プロファイル、発現状態（翻訳状態）の経時プロファイル、シグナル伝達の経時プロファイル、神経電位の経時プロファイルなどがあるがそれらに限定されない。経時プロファイルを生成するためには、あるパラメータ（例えば、転写状態に関連する標識に起因する信号）を連続して記録し、プロファイル生成する必要がある。経時的に測定することは、連続的に測定することであるから、本明細書において「経時プロファイル」は、ときに、連続プロファイルとも称され得る。

### 【0204】

本明細書において細胞の「情報」とは、細胞中に存在する多くの要素を結合して全体として目的を指向させる働きをしているものをいう。

### 【0205】

本明細書において細胞、生物などの「状態」とは、細胞の種々のパラメータ（例えば、細胞周期、外来因子に対する応答、シグナル伝達、遺伝子発現、遺伝子の転写など）に関する状況をさす。そのような状態としては、例えば、分化状態、未分化状態、外来因子に対する細胞応答、細胞周期、増殖状態などが挙げられるがそれらに限定されない。本明細書では、特に、対象となる生物の環境、例えば、温度、湿度（例えば、絶対湿度、相対湿度など）、pH、塩濃度（例えば、塩全体の濃度または特定の塩の濃度）、栄養（例えば、炭水化物量など）、金属（例えば、金属全体の量または特定の金属（例えば、重金属）の濃度など）、ガス（例えば、ガス全体の量または特定のガスの量）、有機溶媒（例えば、有機溶媒全体の量または特定の有機溶媒（例えば、エタノールなど）の量）、圧力（例えば、局所圧または全体の圧など）、気圧、粘性、流速（例えば、培地中に生物が存在する場合のその培地の流速など）、光度（ある特定波長の光量など）、光波長（例えば、可視光のほか紫外線、赤外線なども含み得る）、電磁波、放射線、重力、張力、音波、対象となる生物とは異なる他の生物（例えば、寄生虫、病

原菌など)、化学薬品(例えば、医薬品など)、抗生物質、天然物、精神的ストレス、物理的ストレスなどのようなパラメータに対する反応性または耐性を、そのような状態に関する指標として使用することができる。

#### 【0206】

本明細書においてある主体にとって「環境」(environment、Umggebung)とは、その主体に対するその外圍をいう。環境は、種々の構成要素、状態量が認められ、これらは環境要因といわれる、上記のようなパラメータが例示される。環境要因は、通常、非生物的環境要因と生物的環境要因とに大別され得る。非生物的環境要因(無機的環境)を物理的と化学的とに、あるいは気候的と土壌的とに区別することもある。こうした種々の環境要因の生物に対する作用は、各々が独立的して行われるとは限らず、互いに関連しあっている場合が多い。したがって、本明細書では、環境は、それぞれの要因ごとに観察してもよいし、環境要因の総体(種々のパラメータの総体)として認識されてもよい。このような環境を同一に保つすることは従来困難であると考えられてきた。これは特に、細胞の維持が困難であること、細胞をうまく固定することができず、しかも、導入を目的とする遺伝子などの物質が細胞内に導入されることが困難であることに起因する。本発明は、少なくともこれらの1つを解決した。なお、本明細書において「同一の環境」とは、細胞にとって実質的に同一の環境であることを意味する。したがって、細胞が同様に増殖、分化などを行うことができる限り、そのような環境は同一の環境であるといえる。

#### 【0207】

そのような環境を考慮する要因としては、例えば、温度、湿度、pH、塩濃度、栄養、金属、ガス、有機溶媒、圧力、気圧、粘性、流速、光度、光波長、電磁波、放射線、重力、張力、音波、対象となる生物とは異なる他の生物(例えば、寄生虫)、化学薬品、抗生物質、天然物、化学的ストレスおよび物理的ストレスからなる群より選択される少なくとも1つの因子をパラメータとして包含する。

#### 【0208】

ここで、温度としては、例えば、高温、低温、超高温(例えば、95℃など)、超低温(例えば、-80℃など)、150~-270℃のような広汎な温度が

挙げられるがそれらに限定されない。

【0209】

湿度としては、例えば、相対湿度 100%、相対湿度 0% など 0～100% の間の任意の点が挙げられるがそれらに限定されない。

【0210】

pH としては、例えば、0～14 の任意の点が挙げられるがそれらに限定されない。

【0211】

塩濃度としては、例えば、NaCl 濃度（3% など）、他の塩の塩濃度 0～100% のうちの任意の点が挙げられるがそれらに限定されない。

【0212】

栄養としては、例えば、タンパク質、グルコース、脂質、ビタミン、無機塩等が挙げられるがそれらに限定されない。

【0213】

金属としては、例えば、重金属（例えば、水銀、カドミウムなど）、鉛、金、ウラン、銀が挙げられるがそれらに限定されない。

【0214】

ガスとしては、例えば、酸素、窒素、二酸化炭素、一酸化炭素、一酸化窒素、およびそれらの混合物などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0215】

有機溶媒としては、例えば、エタノール、メタノール、キシレン、プロパノールなどが挙げられるがそれらに限定されない。

【0216】

圧力としては、例えば、0～10 トン/cm<sup>2</sup> の任意の点などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0217】

気圧としては、例えば、0～100 気圧の任意の点などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0218】



粘性としては、例えば、水、グリセロールなど任意の流体またはそれらの混合物中の粘性が挙げられるがそれらに限定されない。

【0219】

流速としては、例えば、0～光速の任意の点などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0220】

光度としては、例えば、暗黒～太陽光の間の一点などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0221】

光波長としては、例えば、可視光線、紫外線（UV-A、UV-B、UV-C など）、赤外線（遠赤外線、近赤外線など）などの任意の波長が挙げられるがそれらに限定されない。

【0222】

電磁波としては、任意の波長のものが挙げられる。

【0223】

放射線としては、任意の強度のものが挙げられる。

【0224】

重力としては、地球上の任意の重力または無重力～地球上の重力の間の1点、あるいは地球上の重力以上の任意の一点が挙げられるがそれらに限定されない。

【0225】

張力としては、任意の強度のものが挙げられる。

【0226】

音波としては、任意の強度および波長のものが挙げられる

対象となる生物とは異なる他の生物としては、例えば、寄生虫、病原菌、昆虫、線虫が挙げられるがそれらに限定されない。

【0227】

化学薬品としては、例えば、塩酸、硫酸、苛性ソーダが挙げられるがそれらに限定されない。

【0228】

抗生物質としては、例えば、ペニシリン、カナマイシン、ストレプトマイシン、キノロン等が挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0229】

天然物としては、例えば、ふぐ毒、蛇毒、アルカロイド等が挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0230】

物理的ストレスとしては、例えば、振動、騒音、電気、衝撃が挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0231】

本明細書において「転写制御配列」とは、遺伝子の転写レベルを調節することができる配列をいう。そのような配列は、少なくとも2ヌクレオチド長を有する。そのような配列としては、代表的に、プロモーター、エンハンサー、サイレンサー、ターミネーター、他のゲノム構造中構造遺伝子のフランキング配列およびエキソン以外のゲノム配列、ならびにエキソン中の配列などが挙げられるがそれらに限定されない。本発明において用いられる転写制御配列は、特定の種類に関するものではない。むしろ、転写制御配列として重要な情報は、その経時的な変動である。このような変動は、(細胞状態の変化) プロセスともいう。従って、本発明では、このような転写制御配列は、任意に選択することができる。そのような転写制御配列の中には、従来はマーカーとして使用されていなかったものを含んでいてもよい。好ましくは、転写制御配列は、転写因子に結合する能力を有する。

#### 【0232】

本明細書において「転写因子」とは、遺伝子の転写の過程を調節する因子をいう。転写因子は、主として転写開始反応を調節する因子をさす。RNAポリメラーゼをDNA上のプロモーター領域に配置するために必要な基本転写因子群、および転写領域の上流や下流に存在するシス作用要素に結合してRNAの合成開始頻度を調節する各種の転写調節因子に大別される。

#### 【0233】

基本転写因子群はRNAポリメラーゼの種類に応じて用意されているが、TA

TA結合タンパク質は全転写系に共通であるとされている。転写因子の種類は多岐にわたるが、通常、構造上DNA結合に必要な部分と転写活性化または抑制に必要な部分とからなることが多い。DNA結合部位をもちシス作用要素に結合することができる因子を総称してトランス作用因子ともいう。

#### 【0234】

転写活性化または抑制に必要な部分は、他の転写因子や基本転写因子群との相互作用に関与しており、DNAや転写開始複合体の構造変化を通して転写調節を果たしていると考えられている。これら各部の構造上の特性から転写調節因子はいくつかのグループあるいはファミリーに分類され、発生または細胞分化において重要な役割をもつ因子も多い。

#### 【0235】

そのような転写因子としては、例えば、STAT1、STAT2、STAT3、GAS、NFAT、Myc、AP1、CREB、NF $\kappa$ B、E2F、Rb、p53、RUNX1、RUNX2、RUNX3、Nkx-2、CF2-11、Skn-1、SRY、HFH-2、Oct-1、Oct-3 Sox-5、HNF-3b、PPAR $\gamma$ などが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0236】

本明細書において「ターミネーター」とは、通常遺伝子のタンパク質をコードする領域の下流に位置し、DNAがmRNAに転写される際の転写の終結、ポリA配列の付加に関与する配列をいう。ターミネーターは、mRNAの安定性に関与して遺伝子の発現量に影響を及ぼすことが知られている。

#### 【0237】

本明細書において「プロモーター」とは、遺伝子の転写の開始部位を決定し、またその頻度を直接的に調節するDNA上の領域をいい、通常RNAポリメラーゼが結合して転写を始める塩基配列である。したがって、本明細書においてある遺伝子のプロモーターの働きを有する部分を「プロモーター部分」という。プロモーターの領域は、通常、推定タンパク質コード領域の第1エキソンの上流約2kbp以内の領域であることが多いので、DNA解析用ソフトウェアを用いてゲノム塩基配列中のタンパク質コード領域を予測すれば、プロモータ領域を推定す

ることとはできる。推定プロモーター領域は、構造遺伝子ごとに変動するが、通常構造遺伝子上流にあるが、これらに限定されず、構造遺伝子下流にもあり得る。好ましくは、推定プロモーター領域は、第一エクソン翻訳開始点から上流約 2 k b p 以内に存在する。プロモーターとしては、例えば、構成的プロモーター、特異的プロモーターおよび誘導性プロモーターなどが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0238】

本明細書において「エンハンサー」とは、目的遺伝子の発現効率を高めるために用いられる配列をいう。そのようなエンハンサーは当該分野において周知である。エンハンサーは複数個用いられ得るが 1 個用いられてもよいし、用いなくともよい。

#### 【0239】

本明細書において「サイレンサー」とは、遺伝子発現を抑制し静止する機能を有する配列をいう。本発明では、サイレンサーとしてはその機能を有する限り、どのようなものを用いてもよく、サイレンサーを用いなくともよい。

#### 【0240】

本明細書において「作動可能に連結された（る）」とは、所望の配列の発現（作動）がある転写翻訳調節配列（例えば、プロモーター、エンハンサー、サイレンサーなど）または翻訳調節配列の制御下に配置されることをいう。プロモーターが遺伝子に作動可能に連結されるためには、通常、その遺伝子のすぐ上流にプロモーターが配置されるが、必ずしも隣接して配置される必要はない。

#### 【0241】

本明細書では、他のゲノム構造中構造遺伝子のフランキング配列およびエクソン以外のゲノム配列、ならびにエクソン中の配列もまた重要であり得る。例えば、上述の特定の名称が付された配列以外の構造遺伝子のフランキング配列もまた、「プロセス」という観点では、転写制御に関連することが充分予想される。従って、そのようなフランキング配列もまた、本明細書では、転写制御配列に含まれる。エクソン以外のゲノム配列およびエクソン中の配列もまた、「プロセス」という観点では、転写制御に関連することが充分予想される。従って、エクソン

以外のゲノム配列およびエキソン中の配列もまた、本明細書では、転写制御配列に含まれる。

#### 【0242】

本明細書において「RNA i」とは、RNA interferenceの略称で、二本鎖RNA (dsRNAともいう) のようなRNA iを引き起こす因子を細胞に導入することにより、相同なmRNAが特異的に分解され、遺伝子産物の合成が抑制される現象およびそれに用いられる技術をいう。本明細書においてRNA iはまた、場合によっては、RNA iを引き起こす因子と同義に用いられ得る。

#### 【0243】

本明細書において「RNA iを引き起こす因子」とは、RNA iを引き起こすことができるような任意の因子をいう。本明細書において「遺伝子」に対して「RNA iを引き起こす因子」とは、その遺伝子に関するRNA iを引き起こし、RNA iがもたらす効果（例えば、その遺伝子の発現抑制など）が達成されることをいう。そのようなRNA iを引き起こす因子としては、例えば、標的遺伝子の核酸配列の一部に対して少なくとも約70%の相同性を有する配列またはストリンジントな条件下でハイブリダイズする配列を含む、少なくとも10ヌクレオチド長の二本鎖部分を含むRNAまたはその改変体が挙げられるがそれに限定されない。ここで、この因子は、好ましくは、3' 突出末端を含み、より好ましくは、3' 突出末端は、2ヌクレオチド長以上のDNA（例えば、2～4ヌクレオチド長のDNAであり得る。

#### 【0244】

理論に束縛されないが、RNA iが働く機構として考えられるものの一つとして、dsRNAのようなRNA iを引き起こす分子が細胞に導入されると、比較的長い（例えば、40塩基対以上）RNAの場合、ヘリカーゼドメインを持つダイサー (Dicer) と呼ばれるRNase III様のヌクレアーゼがATP存在下で、その分子を3' 末端から約20塩基対ずつ切り出し、短鎖dsRNA (siRNAとも呼ばれる) を生じる。本明細書において「siRNA」とは、short interfering RNAの略称であり、人工的に化学合成さ

れるかまたは生化学的に合成されたものか、あるいは生物体内で合成されたものか、あるいは約40塩基以上の二本鎖RNAが体内で分解されてできた10塩基対以上の短鎖二本鎖RNAをいい、通常、5'-リン酸、3'-OHの構造を有しており、3'末端は約2塩基突出している。このsiRNAに特異的なタンパク質が結合して、RISC (RNA-induced-silencing-complex) が形成される。この複合体は、siRNAと同じ配列を有するmRNAを認識して結合し、RNase III様の酵素活性によってsiRNAの中央部でmRNAを切断する。siRNAの配列と標的として切断するmRNAの配列の関係については、100%一致することが好ましい。しかし、siRNAの中央から外れた位置についての塩基の変異については、完全にRNAiによる切断活性がなくなるのではなく、部分的な活性が残存する。他方、siRNAの中央部の塩基の変異は影響が大きく、RNAiによるmRNAの切断活性が極度に低下する。このような性質を利用して、変異をもつmRNAについては、その変異を中央に配したsiRNAを合成し、細胞内に導入することで特異的に変異を含むmRNAだけを分解することができる。従って、本発明では、siRNAそのものをRNAiを引き起こす因子として用いることができるし、siRNAを生成するような因子（例えば、代表的に約40塩基以上のdsRNA）をそのような因子として用いることができる。

#### 【0245】

また、理論に束縛されることを希望しないが、siRNAは、上記経路とは別に、siRNAのアンチセンス鎖がmRNAに結合してRNA依存性RNAポリメラーゼ (RdRP) のプライマーとして作用し、dsRNAが合成され、このdsRNAが再びダイサーの基質となり、新たなsiRNAを生じて作用を増幅することも企図される。従って、本発明では、siRNA自体およびsiRNAが生じるような因子もまた、有用である。実際に、昆虫などでは、例えば35分子のdsRNA分子が、1,000コピー以上ある細胞内のmRNAをほぼ完全に分解することから、siRNA自体およびsiRNAが生じるような因子が有用であることが理解される。

#### 【0246】

本発明において s i R N A と呼ばれる、約 20 塩基前後（例えば、代表的には約 21～23 塩基長）またはそれ未満の長さの二本鎖 R N A を用いることができる。このような s i R N A は、細胞に発現させることにより遺伝子発現を抑制し、その s i R N A の標的となる病原遺伝子の発現を抑えることから、疾患の治療、予防、予後などに使用することができる。

#### 【0247】

本発明において用いられる s i R N A は、R N A i を引き起こすことができる限り、どのような形態を採っていてもよい。

#### 【0248】

別の実施形態において、本発明の R N A i を引き起こす因子は、3' 末端に突出部を有する短いヘアピン構造（s h R N A ; s h o r t h a i r p i n R N A）であり得る。本明細書において「s h R N A」とは、一本鎖 R N A で部分的に回文状の塩基配列を含むことにより、分子内で二本鎖構造をとり、ヘアピンのような構造となる約 20 塩基対以上の分子をいう。そのような s h R N A は、人工的に化学合成される。あるいは、そのような s h R N A は、センス鎖およびアンチセンス鎖の D N A 配列を逆向きに連結したヘアピン構造の D N A を T 7 R N A ポリメラーゼによりインビトロで R N A を合成することによって生成することができる。理論に束縛されることは希望しないが、そのような s h R N A は、細胞内に導入された後、細胞内で約 20 塩基（代表的には例えば、21 塩基、22 塩基、23 塩基）の長さに分解され、s i R N A と同様に R N A i を引き起こし、本発明の処置効果があることが理解されるべきである。このような効果は、昆虫、植物、動物（哺乳動物を含む）など広汎な生物において発揮されることが理解されるべきである。このように、s h R N A は、s i R N A と同様に R N A i を引き起こすことから、本発明の有効成分として用いることができる。s h R N A はまた、好ましくは、3' 突出末端を有し得る。二本鎖部分の長さは特に限定されないが、好ましくは約 10 ヌクレオチド長以上、より好ましくは約 20 ヌクレオチド長以上であり得る。ここで、3' 突出末端は、好ましくは D N A であり得、より好ましくは少なくとも 2 ヌクレオチド長以上の D N A であり得、さらに好ましくは 2～4 ヌクレオチド長の D N A であり得る。

## 【0249】

本発明において用いられるRNAiを引き起こす因子は、人工的に合成した（例えば、化学的または生化学的）ものでも、天然に存在するものでも用いることができ、この両者の間で本発明の効果に本質的な違いは生じない。化学的に合成したものでは、液体クロマトグラフィーなどにより精製をすることが好ましい。

## 【0250】

本発明において用いられるRNAiを引き起こす因子は、インビトロで合成することもできる。この合成系において、T7 RNAポリメラーゼおよびT7プロモーターを用いて、鋳型DNAからアンチセンスおよびセンスのRNAを合成する。これらをインビトロでアニーリングした後、細胞に導入すると、上述のような機構を通じてRNAiが引き起こされ、本発明の効果が達成される。ここでは、例えば、リン酸カルシウム法でそのようなRNAを細胞内に導入することができる。

## 【0251】

本発明のRNAiを引き起こす因子としてはまた、mRNAとハイブリダイズし得る一本鎖、あるいはそれらのすべての類似の核酸アナログのような因子も挙げられる。そのような因子もまた、本発明の処置方法および組成物において有用である。

## 【0252】

本明細書において「経時的」とは、時間の経過に対して何らかの行為または現象を関連付けることをいう。

## 【0253】

本明細書において「モニター」または「ディスプレイ」とは、互換可能に使用され、少なくとも1つのパラメータ（例えば、転写に起因する標識信号など）を指標に、細胞の状態を観測することをいう。好ましくは、モニターは、検出機器または計測機器などの機器装置を用いて行われる。より好ましくは、このような機器は、データを記録および／または処理するためにコンピュータに接続される。モニターは、固相支持体（例えば、アレイ、プレートなど）の画像データを得る工程を含み得る。



## 【0254】

本明細書において「リアルタイム」とは、ある状態が、実質的に同時に別の形態で表示される（例えば、ディスプレイ上の画像としてあるいはデータ処理されたグラフとして）ことをいう。そのような場合、リアルタイムは、データ処理にかかる時間だけタイムラグが生じるが、このようなタイムラグは、実質的に無視できる場合は、リアルタイムに包含される。そのようなタイムラグは、通常10秒以内であり、好ましくは1秒以内であり得るが、それらに限定されず、用途によっては、10秒を超える場合もまたリアルタイムと称することがある。

## 【0255】

本明細書において細胞の状態の「判定」は、種々の方法を用いて行うことができる。そのような方法は、数理的処理（例えば、信号処理法、多変量解析など）、経験的処理、位相の変化などを包含するが、それらに限定されない。

## 【0256】

本明細書において「差分」とは、あるプロファイルについて、コントロールプロファイル（例えば、刺激のない場合）の値を差し引いて提示するような数理的処理をいう。

## 【0257】

本明細書において「位相」とは、プロファイルについて言及されるとき、そのプロファイルが基準点（通常0とする）より増えているかまたは減っているかを判定し、それぞれ+または-として表現することおよびそれによる解析をいう。

## 【0258】

本明細書においてプロファイル（例えば、経時プロファイル）と細胞の状態との「相関付け」とは、あるプロファイル（例えば、経時プロファイル）またはその変化の特定の情報を、細胞の状態に対応付けることをいい、そのような関係を相関関係という。従来、プロファイル（例えば、経時プロファイル）と細胞の状態との間の相関付けることは、実質的に不可能であり、そのような関係は知られていなかったことから、本発明において、そのような相関付けを行うことができることは格別の効果といえる。

## 【0259】

本明細書において、相関付けは、少なくとも1つのプロファイルまたはその変動と、細胞、組織、臓器または生体の状態の変化（例えば、親和性、薬剤耐性）とを関連付けること、例えば、あるプロファイルまたはその変動と、細胞の状態の少なくとも1つのパラメータとを定量的または定性的に対応付けることによって行うことができる。相関付けに使用される少なくとも1つのプロファイルの数は、相関付けが行うことができる限り少ない数であってよく、通常少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つ、より好ましくは少なくとも3つであり得るがそれらに限定されない。本発明では、少なくとも2つ、好ましくは少なくとも3つの少なくとも1つのプロファイルを特定することによって、ほぼすべての細胞を特定するに充分であることが判明した。そのような効果は、点で見ていた従来のプロファイリングまたはアッセイでは予測不可能であったことであり、本発明によって初めてもたらされた格別の効果といえる。このような場合、少なくとも1つのプロファイル（例えば、経時プロファイル）と、細胞の状態とを対応付ける場合は、行列式を利用して数学的处理を行ってもよい。1つの好ましい実施形態において、相関付けに使用する少なくとも1つのプロファイル（例えば、プロモーターに関するプロファイル）の数は少なくとも8つであることが有利であり得る。8種類の増減を観察することで、理論的には256種類の変化に対応付けることができ、生体を構成するといわれる300種類程度の細胞の種類の数をほぼ網羅することができるからである。その意味において、そのような糖鎖構造の種類としては、少なくとも9種類、または少なくとも10種類観察対象に含めることがさらに有利であり得る。しかし、本発明の技術を用いれば、実質的には、任意の1つの生物学的因子を選択し、プロファイルデータを取得するだけで、その細胞の状態をかなり理解することが可能である。

#### 【0260】

相関付けの具体的方法としては、例えば、信号処理法（ウェーブレットなどによる）、多変量解析（クラスター解析など）などを利用する方法が挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0261】

相関付けは、あらかじめ行っているが、細胞の判定ごとにコントロール

を使用して行ってもよい。

### 【0262】

本明細書において「外来因子」とは、ある細胞について言及するとき、その細胞において通常内部に存在しない因子（例えば、物質、エネルギーなど）をいう。本明細書において「因子」としては、意図する目的を達成することができる限りどのような物質または他の要素（例えば、電離線、放射線、光、音波などのエネルギー）でもあってもよい。そのような物質としては、例えば、タンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチド、ペプチド、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、核酸（例えば、cDNA、ゲノムDNAのようなDNA、またはmRNA、RNAiのようなRNAを含む）、ポリサッカリド、オリゴサッカリド、脂質、有機低分子（例えば、ホルモン、リガンド、情報伝達物質、有機低分子、コンビナトリアルケミストリで合成された分子、医薬品として利用され得る低分子（例えば、低分子リガンドなど）など）、これらの複合分子が挙げられるがそれらに限定されない。外来因子は、1つ用いられてもよいが、2つ以上の組み合わせを用いてもよい。本明細書において外来因子としては、温度変化、湿度変化、電磁波、電位差、可視光線、赤外線、紫外線、X線、化学物質、圧力、重力変化、ガス分圧および浸透圧などが挙げられるがそれらに限定されない。1つの好ましい実施形態において、外来因子は、生体分子または化学合成物であり得る。

### 【0263】

本明細書において使用される用語「生体分子」とは、生体に関連する分子をいう。本明細書において「生体」とは、生物学的な有機体をいい、動物、植物、菌類、ウイルスなどを含むがそれらに限定されない。従って、本明細書では生体分子は、生体から抽出される分子を包含するが、それに限定されず、生体に影響を与え得る分子であれば生体分子の定義に入る。したがって、コンビナトリアルケミストリで合成された分子、医薬品として利用され得る低分子（たとえば、低分子リガンドなど）もまた生体への効果が意図され得るかぎり、生体分子の定義に入る。そのような生体分子には、タンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチド、ペプチド、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、核酸（例え

ば、cDNA、ゲノムDNAのようなDNA、mRNAのようなRNAを含む)、ポリサッカライド、オリゴサッカライド、脂質、低分子(例えば、ホルモン、リガンド、情報伝達物質、有機低分子など)、これらの複合分子(糖脂質、糖タンパク質、リポタンパク質など)などが包含されるがそれらに限定されない。生体分子にはまた、細胞への導入が企図される限り、細胞自体、組織の一部も包含され得る。通常、生体分子は、核酸、タンパク質、脂質、糖、プロテオリピッド、リポプロテイン、糖タンパク質およびプロテオグリカンなどであり得る。好ましくは、生体分子は、核酸(DNAまたはRNA)またはタンパク質を含む。別の好ましい実施形態では、生体分子は、核酸(例えば、ゲノムDNAまたはcDNA、あるいはPCRなどによって合成されたDNA)である。他の好ましい実施形態では、生体分子はタンパク質であり得る。好ましくは、そのような生体分子は、ホルモンまたはサイトカインであり得る。

#### 【0264】

本明細書において「化学合成物」とは、通常の化学技術を用いて合成され得るすべての物質をいう。そのような合成技術は、当該分野において周知であり、当業者は、適宜そのような技術を組み合わせて化学合成物を製造することができる。

#### 【0265】

本明細書において使用される「サイトカイン」は、当該分野において用いられる最も広義の意味と同様に定義され、細胞から産生され同じまたは異なる細胞に作用する生理活性物質をいう。サイトカインは、一般にタンパク質またはポリペプチドであり、免疫応答の制禦作用、内分泌系の調節、神経系の調節、抗腫瘍作用、抗ウイルス作用、細胞増殖の調節作用、細胞分化の調節作用などを有する。本明細書では、サイトカインはタンパク質形態または核酸形態あるいは他の形態であり得るが、実際に作用する時点においては、サイトカインは通常はタンパク質形態を意味する。本明細書において用いられる「増殖因子」とは、細胞の増殖を促進または制御する物質をいう。増殖因子は、成長因子または発育因子ともいわれる。増殖因子は、細胞培養または組織培養において、培地に添加されて血清高分子物質の作用を代替し得る。多くの増殖因子は、細胞の増殖以外に、分化状

態の制御因子としても機能することが判明している。サイトカインには、代表的には、インターロイキン類、ケモカイン類、コロニー刺激因子のような造血因子、腫瘍壊死因子、インターフェロン類が含まれる。増殖因子としては、代表的には、血小板由来増殖因子 (PDGF)、上皮増殖因子 (EGF)、線維芽細胞増殖因子 (FGF)、肝実質細胞増殖因子 (HGF)、血管内皮増殖因子 (VEGF) のような増殖活性を有するものが挙げられる。

#### 【0266】

本明細書において使用される「ホルモン」とは、当該分野において通常用いられる最も広い意味と同じ意味で用いられ、動植物の特定の器官または細胞で作られ、産出される部位からは隔たった器官にその特異的な生理作用をあらわす生理的有機化合物をいう。そのようなホルモンとしては、成長ホルモン、性ホルモン、甲状腺ホルモンなどが挙げられるがそれらに限定されない。そのようなホルモンは、一部、上記サイトカインとそのさす範囲が重複し得る。

#### 【0267】

本明細書において「アクチン作用物質」とは、細胞内のアクチンに対して直接的または間接的に相互作用して、アクチンの形態または状態を変化させる機能を有する物質をいう。そのような物質としては、例えば、細胞外マトリクスタンパク質 (例えば、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニンなど) が挙げられるがそれらに限定されない。そのようなアクチン作用物質には、以下のようなアッセイによって同定される物質が含まれる。本明細書において、アクチンへの相互作用の評価は、アクチン染色試薬 (Molecular Probes, Texas Red-X phalloidin) などによりアクチンを可視化した後、顕鏡し、アクチン凝集や細胞伸展を観察することによってアクチンの凝集、再構成および／または細胞伸展速度の向上という現象が確認されることによって判定される。これらの判定は、定量的または定性的に行われ得る。このようなアクチン作用物質は、トランスフェクションの効率を上昇させるために本発明において利用される。本発明において用いられるアクチン作用物質が生体に由来する場合、その由来は何でもよく、例えば、ヒト、マウス、ウシなどの哺乳動物種があげられる。

## 【0268】

本明細書において「細胞接着因子」もしくは「細胞接着分子」(Cell adhesion molecule)または「接着因子」もしくは「接着分子」とは、互換可能に使用され、2つ以上の細胞の互いの接近(細胞接着)または基質と細胞との間の接着を媒介する分子をいう。一般には、細胞と細胞の接着(細胞間接着)に関する分子(cell-cell adhesion molecule)と、細胞と細胞外マトリックスとの接着(細胞-基質接着)に関与する分子(cell-substrate adhesion molecule)に分けられる。本発明の組織片では、いずれの分子も有用であり、有効に使用することができる。従って、本明細書において細胞接着分子は、細胞-基質接着の際の基質側のタンパク質を包含するが、本明細書では、細胞側のタンパク質(例えば、インテグリンなど)も包含され、タンパク質以外の分子であっても、細胞接着を媒介する限り、本明細書における細胞接着分子または細胞接着分子の概念に入る。

## 【0269】

細胞間接着に関しては、カドヘリン、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する多くの分子(NCAM、L1、ICAM、ファシクリンII、IIIなど)、セレクトリンなどが知られており、それぞれ独特な分子反応により細胞膜を結合させることも知られている。

## 【0270】

他方、細胞-基質接着のために働く主要な細胞接着分子はインテグリンで、細胞外マトリックスに含まれる種々のタンパク質を認識し結合する。これらの細胞接着分子はすべて細胞膜表面にあり、一種のレセプター(細胞接着受容体)とみなすこともできる。従って、細胞膜にあるこのようなレセプターもまた本発明の組織片において使用することができる。そのようなレセプターとしては、例えば、 $\alpha$ インテグリン、 $\beta$ インテグリン、CD44、シンデカンおよびアグリカンなどが挙げられるがそれに限定されない。細胞接着に関する技術は、上述のもののほかの知見も周知であり、例えば、細胞外マトリックス-臨床への応用-メデイカルレビュー社に記載されている。

## 【0271】

ある分子が細胞接着分子であるかどうかは、生化学的定量（SDS-PAGE法、標識コラーゲン法）、免疫学的定量（酵素抗体法、蛍光抗体法、免疫組織学的検討）PDR法、ハイブリダイゼーション法などのようなアッセイにおいて陽性となることを決定することにより判定することができる。このような細胞接着分子としては、コラーゲン、インテグリン、フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチン、フィブリノゲン、免疫グロブリンスーパーファミリー（例えば、CD2、CD4、CD8、ICAM1、ICAM2、VCAM1）、セレクトリン、カドヘリンなどが挙げられるがそれに限定されない。このような細胞接着分子の多くは、細胞への接着と同時に細胞間相互作用による細胞活性化の補助シグナルを細胞内に伝達する。そのような補助シグナルを細胞内に伝達することができるかどうかは、生化学的定量（SDS-PAGE法、標識コラーゲン法）、免疫学的定量（酵素抗体法、蛍光抗体法、免疫組織学的検討）PDR法、ハイブリダイゼーション法というアッセイにおいて陽性となることを決定することにより判定することができる。

## 【0272】

細胞接着分子としては、例えば、カドヘリン、免疫グロブリンスーパーファミリー分子（CD2、LFA-3、ICAM-1、CD2、CD4、CD8、ICAM1、ICAM2、VCAM1など）；インテグリンファミリー分子（LFA-1、Mac-1、gpIIb/IIIa、p150、95、VLA1、VLA2、VLA3、VLA4、VLA5、VLA6など）；セレクトリンファミリー分子（L-セレクトリン、E-セレクトリン、P-セレクトリンなど）などが挙げられるがそれらに限定されない。

## 【0273】

本明細書において「細胞外マトリクスタンパク質」とは「細胞外マトリクス」のうちタンパク質であるものをいう。本明細書において「細胞外マトリクス」（ECM）とは「細胞外基質」とも呼ばれ、当該分野において通常用いられる意味と同様の意味で用いられ、上皮細胞、非上皮細胞を問わず体細胞（somatic cell）の間に存在する物質をいう。細胞外マトリクスは、組織の支持だ

けでなく、すべての体細胞の生存に必要な内部環境の構成に関与する。細胞外マトリクスは一般に、結合組織細胞から産生されるが、一部は上皮細胞や内皮細胞のような基底膜を保有する細胞自身からも分泌される。線維成分とその間を満たす基質とに大別され、線維成分としては膠原線維および弾性線維がある。基質の基本構成成分はグリコサミノグリカン（酸性ムコ多糖）であり、その大部分は非コラーゲン性タンパクと結合してプロテオグリカン（酸性ムコ多糖-タンパク複合体）の高分子を形成する。このほかに、基底膜のラミニン、弾性線維周囲のミクロフィブリル（microfibril）、線維、細胞表面のフィブロネクチンなどの糖タンパクも基質に含まれる。特殊に分化した組織でも基本構造は同一で、例えば硝子軟骨では軟骨芽細胞によって特徴的に大量のプロテオグリカンを含む軟骨基質が産生され、骨では骨芽細胞によって石灰沈着が起こる骨基質が産生される。従って、本発明において用いられる細胞外マトリクスとしては、例えば、コラーゲン、エラスチン、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン、弾性繊維、膠原繊維などが挙げられるがそれに限定されない。

#### 【0274】

本明細書において「レセプター」とは、細胞上または核内などに存在し、外界からの因子または細胞内の因子に対する結合能を有し、その結合によりシグナルが伝達される分子をいう。レセプターは通常タンパク質の形態をとる。レセプターの結合パートナーは、通常リガンドという。

#### 【0275】

本明細書において「アゴニスト」とは、ある生体作用物質（リガンド）のレセプターに結合し、その物質のもつ作用と同じ（あるいは類似の）作用を現わす因子をいう。

#### 【0276】

本明細書において「アンタゴニスト」とは、ある生体作用物質（リガンド）のレセプターへの結合に拮抗的に働き、それ自身はそのレセプターを介した生理作用を現わさない因子をいう。拮抗薬、遮断剤（ブロッカー）、阻害剤（インヒビター）などもこのアンタゴニストに包含される。



## 【0277】

(デバイス・固相支持体)

本明細書において「デバイス」とは、装置の一部または全部を構成することができる部分をいい、支持体（好ましくは固相支持体）およびその支持体に担持されるべき標的物質などから構成される。そのようなデバイスとしては、チップ、アレイ、マイクロタイタプレート、細胞培養プレート、シャーレ、フィルム、ビーズなどが挙げられるがそれらに限定されない。

## 【0278】

本明細書において使用される「支持体」は、生体分子のような物質を固定することができる材料 (material) をいう。支持体の材料としては、共有結合かまたは非共有結合のいずれかで、本発明において使用される生体分子のような物質に結合する特性を有するかまたはそのような特性を有するように誘導体化され得る、任意の固体材料が挙げられる。

## 【0279】

支持体として使用するためのそのような材料としては、固体表面を形成し得る任意の材料が使用され得るが、例えば、ガラス、シリカ、シリコン、セラミック、二酸化珪素、プラスチック、金属（合金も含まれる）、天然および合成のポリマー（例えば、ポリスチレン、セルロース、キトサン、デキストラン、およびナイロン）などが挙げられるがそれらに限定されない。支持体は、複数の異なる材料の層から形成されていてもよい。例えば、ガラス、石英ガラス、アルミナ、サファイア、フォスフェイト、酸化珪素、炭化珪素、窒化珪素などの無機絶縁材料を使用することができる。ポリエチレン、エチレン、ポリプロピレン、ポリイソブチレン、ポリエチレンテレフタレート、不飽和ポリエステル、含フッ素樹脂、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリ酢酸ビニル、ポリビニルアルコール、ポリビニルアセタール、アクリル樹脂、ポリアクリロニトリル、ポリスチレン、アセタール樹脂、ポリカーボネート、ポリアミド、フェノール樹脂、ユリア樹脂、エポキシ樹脂、メラミン樹脂、スチレン・アクリロニトリル共重合体、アクリロニトリルブタジエンスチレン共重合体、シリコーン樹脂、ポリフェニレンオキサイド、ポリスルホンなどの有機材料を用いることができる。本発明におい

てはまた、ニトロセルロース膜、ナイロン膜、PVDF膜など、プロッティングに使用される膜を用いることもできる。支持体を構成する材料が固相である場合、本明細書において特に「固相支持体」という。本明細書において、プレート、マイクロウェルプレート、チップ、スライドガラス、フィルム、ビーズ、金属（表面）などの形態をとり得る。支持体はコーティングされていてもよく、コーティングされていなくてもよい。

#### 【0280】

本明細書において「液相」とは、当該分野において通常用いられる意味と同じ意味で用いられ、通常、溶液中での状態をいう。

#### 【0281】

本明細書において「固相」とは、当該分野において用いられる意味と同じ意味で用いられ、通常、固体の状態をいう。本明細書において液体および固体を総合して流体ということがある。

#### 【0282】

本明細書において使用される「基板」とは、本発明のチップまたはアレイが構築される材料（好ましくは固体）をいう。したがって、基板はプレートの概念に包含される。基板の材料としては、共有結合かまたは非共有結合のいずれかで、本発明において使用される生体分子に結合する特性を有するかまたはそのような特性を有するように誘導体化され得る、任意の固体材料が挙げられる。

#### 【0283】

プレートおよび基板として使用するためのそのような材料としては、固体表面を形成し得る任意の材料が使用され得るが、例えば、ガラス、シリカ、シリコン、セラミック、二酸化珪素、プラスチック、金属（合金も含まれる）、天然および合成のポリマー（例えば、ポリスチレン、セルロース、キトサン、デキストラン、およびナイロン）が挙げられるがそれらに限定されない。基板は、複数の異なる材料の層から形成されていてもよい。例えば、ガラス、石英ガラス、アルミナ、サファイア、フォスフェイト、炭化珪素、酸化珪素、窒化珪素などの無機絶縁材料を使用できる。また、ポリエチレン、エチレン、ポリプロピレン、ポリイソブチレン、ポリエチレンテレフタレート、不飽和ポリエステル、含フッ素樹

脂、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリ酢酸ビニル、ポリビニルアルコール、ポリビニルアセタール、アクリル樹脂、ポリアクリロニトリル、ポリスチレン、アセタール樹脂、ポリカーボネート、ポリアミド、フェノール樹脂、ユリア樹脂、エポキシ樹脂、メラミン樹脂、スチレン・アクリロニトリル共重合体、アクリロニトリルブタジエンスチレン共重合体、シリコーン樹脂、ポリフェニレンオキサイド、ポリスルホン等の有機材料を用いることができる。基板として好ましい材質は、測定機器などの種々のパラメータによって変動し、当業者は、上述のような種々の材料から適切なものを適宜選択することができる。トランスフェクションアレイのためには、スライドガラスが好ましい。好ましくは、そのような基材は、コーティングされ得る。

#### 【0284】

本明細書において「コーティング」とは、固相支持体または基板について用いられるとき、その固相支持体または基板の表面上にある物質の膜を形成させることおよびそのような膜をいう。コーティングは種々の目的で行われ、例えば、固相支持体および基板の品質向上（例えば、寿命の向上、耐酸性などの耐環境性の向上）、固相支持体または基板に結合されるべき物質の親和性の向上などを目的とすることが多い。そのようなコーティングのための物質としては、種々の物質が用いられ得、上述の固相支持体および基板自体に使用される物質のほか、DNA、RNA、タンパク質、脂質などの生体物質、ポリマー（例えば、ポリーレーリジン、MAS（松浪硝子、岸和田、日本から入手可能）、疎水性フッ素樹脂）、シラン（APS（例えば、 $\gamma$ -アミノプロピルシラン））、金属（例えば、金など）が使用され得るがそれらに限定されない。そのような物質の選択は当業者の技術範囲内にあり、当該分野において周知の技術を用いて場合ごとに選択することができる。一つの好ましい実施形態では、そのようなコーティングは、ポリーレーリジン、シラン、（例えば、エポキシシランまたはメルカプトシラン、APS（ $\gamma$ -アミノプロピルシラン））、MAS、疎水性フッ素樹脂、金のような金属を用いることが有利であり得る。このような物質は、細胞または細胞を含む物体（例えば、生体、臓器など）に適合する物質を用いることが好ましい。

#### 【0285】

本明細書において「チップ」または「マイクロチップ」は、互換可能に用いられ、多様の機能をもち、システムの一部となる超小型集積回路をいう。チップとしては、例えば、DNAチップ、プロテインチップなどが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0286】

本明細書において「アレイ」とは、1以上（例えば、1000以上）の標的物質を含む組成物（例えば、DNA、タンパク質、トランスフェクト混合物）が整列されて配置されたパターンまたはパターンを有する基板（例えば、チップ）そのものをいう。アレイの中で、小さな基板（例えば、10×10mm上など）上にパターン化されているものはマイクロアレイというが、本明細書では、マイクロアレイとアレイとは互換可能に使用される。従って、上述の基板より大きなものにパターン化されたものでもマイクロアレイと呼ぶことがある。例えば、アレイはそれ自身固相表面または膜に固定されている所望のトランスフェクト混合物のセットで構成される。アレイは好ましくは同一のまたは異なる抗体を少なくとも $10^2$ 個、より好ましくは少なくとも $10^3$ 個、およびさらに好ましくは少なくとも $10^4$ 個、さらにより好ましくは少なくとも $10^5$ 個を含む。これらの抗体は、好ましくは表面が125×80mm、より好ましくは10×10mm上に配置される。形式としては、96ウェルマイクロタイタープレート、384ウェルマイクロタイタープレートなどのマイクロタイタープレートの大きさのものから、スライドガラス程度の大きさのものが企図される。固定される標的物質を含む組成物は、1種類であっても複数種類であってもよい。そのような種類の数は、1個～スポット数までの任意の数であり得る。例えば、約10種類、約100種類、約500種類、約1000種類の標的物質を含む組成物が固定され得る。

#### 【0287】

基板のような固相表面または膜には、上述のように任意の数の標的物質（例えば、抗体のようなタンパク質）が配置され得るが、通常、基板1つあたり、 $10^8$ 個の生体分子まで、他の実施形態において $10^7$ 個の生体分子まで、 $10^6$ 個の生体分子まで、 $10^5$ 個の生体分子まで、 $10^4$ 個の生体分子まで、 $10^3$ 個の生体分子まで、または $10^2$ 個の生体分子までの個の生体分子が配置され得るが、

10<sup>8</sup>個の生体分子を超える標的物質を含む組成物が配置されていてもよい。これらの場合において、基板の大きさはより小さいことが好ましい。特に、標的物質を含む組成物（例えば、抗体のようなタンパク質）のスポットの大きさは、単一の生体分子のサイズと同じ小さくあり得る（これは、1-2 nmの桁であり得る）。最小限の基板の面積は、いくつかの場合において基板上の生体分子の数によって決定される。本発明では、細胞への導入が企図される標的物質を含む組成物は、通常、0.01 mm～10 mmのスポット状に共有結合あるいは物理的相互作用によって配列固定されている。

#### 【0288】

アレイ上には、生体分子の「スポット」が配置され得る。本明細書において「スポット」とは、標的物質を含む組成物の一定の集合をいう。本明細書において「スポッティング」とは、ある標的物質を含む組成物のスポットをある基板またはプレートに作製することをいう。スポッティングはどのような方法でも行うことができ、例えば、ピペッティングなどによって達成され得、あるいは自動装置で行うこともでき、そのような方法は当該分野において周知である。

#### 【0289】

本明細書において使用される用語「アドレス」とは、基板上のユニークな位置をいい、他のユニークな位置から弁別可能であり得るものをいう。アドレスは、そのアドレスを伴うスポットとの関連づけに適切であり、そしてすべての各々のアドレスにおける存在物が他のアドレスにおける存在物から識別され得る（例えば、光学的）、任意の形状を採り得る。アドレスを定める形は、例えば、円状、楕円状、正方形、長方形であり得るか、または不規則な形であり得る。したがって、「アドレス」は、抽象的な概念を示し、「スポット」は具体的な概念を示すために使用され得るが、両者を区別する必要がない場合、本明細書においては、「アドレス」と「スポット」とは互換的に使用され得る。

#### 【0290】

各々のアドレスを定めるサイズは、とりわけ、その基板の大きさ、特定の基板上のアドレスの数、標的物質を含む組成物の量および／または利用可能な試薬、微粒子のサイズおよびそのアレイが使用される任意の方法のために必要な解像度

の程度に依存する。大きさは、例えば、1-2 nmから数 cmの範囲であり得るが、そのアレイの適用に一致した任意の大きさが可能である。

#### 【0291】

アドレスを定める空間配置および形状は、そのマイクロアレイが使用される特定の適用に適合するように設計される。アドレスは、密に配置され得、広汎に分散され得るか、または特定の型の分析物に適切な所望のパターンへとサブグループ化され得る。

#### 【0292】

マイクロアレイについては、ゲノム機能研究プロトコール（実験医学別冊 ポストゲノム時代の実験講座1）、ゲノム医科学とこれからのゲノム医療（実験医学増刊）などに広く概説されている。

#### 【0293】

マイクロアレイから得られるデータは膨大であることから、クローンとスポットとの対応の管理、データ解析などを行うためのデータ解析ソフトウェアが重要である。そのようなソフトウェアとしては、各種検出システムに付属のソフトウェアが利用可能である（Ermolaeva Oら（1998）Nat. Genet. 20:19-23）。また、データベースのフォーマットとしては、例えば、Affymetrixが提唱しているGATC（genetic analysis technology consortium）と呼ばれる形式が挙げられる。

#### 【0294】

微細加工については、例えば、Campbell, S. A. (1996). The Science and Engineering of Microelectronic Fabrication, Oxford University Press; Zaut, P. V. (1996). Micromicroarray Fabrication: a Practical Guide to Semiconductor Processing, Semiconductor Services; Madou, M. J. (1997). Fundamentals of Microfabrication, CRC 15 P

ress; Rai-Choudhury, P. (1997). Handbook of Microlithography, Micromachining, & Microfabrication: Microlithographyなどに記載されており、これらは本明細書において関連する部分が参考として援用される。

#### 【0295】

(検出)

本発明の細胞分析または判定方法では、細胞またはそれに相互作用する物質に起因する情報を検出することができる限り、種々の検出方法および検出手段を用いることができる。そのような検出方法および検出手段としては、例えば、目視、光学顕微鏡、共焦点顕微鏡、蛍光顕微鏡、レーザー光源を用いた読取装置、表面プラズモン共鳴 (SPR) イメージング、電気信号、化学的または生化学的マーカーのいずれかあるいは複数種を用いる方法および手段を挙げることができるがそれらに限定されない。そのような検出装置としてはまた、蛍光分析装置、分光光度計、シンチレーションカウンター、CCD、ルミノメーターなども挙げられるがそれらに限定されず、生体分子を検出することができる手段であればどのようなものでもよい。

#### 【0296】

本明細書において「マーカー」とは、目的とする物質または状態についてレベルまたは頻度を反映する生物学的因子をいう。そのようなマーカーとしては、例えば、遺伝子をコードする核酸、遺伝子産物、代謝産物、レセプター、リガンド、抗体などが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0297】

したがって、本明細書において細胞の状態に関連するマーカーとは、転写制御因子のほか、細胞の状態を示す細胞内因子（例えば、遺伝子をコードする核酸、遺伝子産物（例えば、mRNA、タンパク質、翻訳後修飾タンパク質）、代謝産物、レセプターなど）に対して相互作用する因子（例えば、リガンド、抗体など、相補的な核酸）などが挙げられるがそれらに限定されない。本発明では、このようなマーカーについて経時プロファイルを生成して解析することも包含する。

そのようなマーカーは、好ましくは、目的とする因子に対して特異的に相互作用することが有利であり得る。そのような特異性は、例えば、類似の分子よりも目的の分子に対する相互作用の程度が有意に高い性質を言う。本発明では、好ましくは、そのようなマーカーは、細胞内部に存在するが、細胞外のものであってもよい。

#### 【0298】

本明細書において「標識」とは、目的となる分子または物質を他から識別するための存在（たとえば、物質、エネルギー、電磁波など）をいう。そのような標識方法としては、R I（ラジオアイソトープ）法、蛍光法、ビオチン法、化学発光法等を挙げることができる。上記の核酸断片および相補性を示すオリゴヌクレオチドを何れも蛍光法によって標識する場合には、蛍光発光極大波長が互いに異なる蛍光物質によって標識を行う。蛍光発光極大波長の差は、10 nm以上であることが好ましい。蛍光物質としては、核酸の塩基部分と結合できるものであれば何れも用いることができるが、シアニン色素（例えば、Cy Dye<sup>TM</sup>シリーズのCy 3、Cy 5等）、ローダミン 6 G 試薬、N-アセトキシ-N<sup>2</sup>-アセチルアミノフルオレン（AAF）、AAIF（AAFのヨウ素誘導体）等を使用することが好ましい。蛍光発光極大波長の差が10 nm以上である蛍光物質としては、例えば、Cy 5とローダミン 6 G 試薬との組み合わせ、Cy 3とフルオレセインとの組み合わせ、ローダミン 6 G 試薬とフルオレセインとの組み合わせ等を挙げることができる。本発明では、このような標識を利用して、使用される検出手段に検出され得るように目的とする対象を改変することができる。そのような改変は、当該分野において公知であり、当業者は標識および目的とする対象に応じて適宜そのような方法を実施することができる。

#### 【0299】

本明細書において「相互作用」には、疎水性相互作用、親水性相互作用、水素結合、ファンデルワールス力、イオン性相互作用、非イオン性相互作用、静電的相互作用などが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0300】

本明細書において「相互作用のレベル」とは、2つの物質（細胞などを含む）



の間の相互作用について言及する場合、その2つの物質の間の相互作用の程度または頻度をいう。そのような相互作用のレベルは、当該分野において周知の方法によって測定することができる。そのような方法としては、例えば、実際に相互作用し固定状態にある細胞の数を、例えば、光学顕微鏡、蛍光顕微鏡、位相差顕微鏡などを利用して、直接または間接的に（例えば、反射光強度）計数すること、細胞に特異的なマーカー、抗体、蛍光標識などで染色しその強度を測定することなどが挙げられるがそれらに限定されない。これらのレベルは、マーカーから直接または標識を介して間接的に表示することができる。このような測定値から、例えば、あるスポットにおいて実際に転写または発現する遺伝子の個数または頻度を算出することができる。

### 【0301】

（提示および表示）

本明細書において「表示」および「提示」とは、互換可能に使用され、本発明の方法に従って得られたプロファイルまたはそれに由来する情報を直接または間接的にあるいは情報処理をした形態で具現化することをいう。そのような表示の形態としては、グラフ、写真、表、アニメーションなど種々の方法があり、限定されない。そのような技術としては、例えば、METHODS IN CELL BIOLOGY, VOL. 56, ed. 1998, pp:185-215、A High-Resolution Multimode Digital Microscope System (Sluder & Wolf, Salmon) において、顕微鏡を自動化し、カメラを制御するためのアプリケーションソフトウェアとともに、自動光学顕微鏡の顕微鏡、カメラ、Z軸フォーカス装置を含む、ハードウェアシステムの設計について議論されており、本発明において利用することができる。カメラによるイメージ取得は、Inoue and Spring, Video Microscopy, 2d. Edition, 1997に詳細に記載されており、本明細書において参考文献として援用される。

### 【0302】

リアルタイムの表示および提示もまた、当該分野において周知の技術を用いて

行うことができる。例えば、全てのイメージが取得され、半永久的メモリに格納された後、あるいはイメージの取得と実質的に同時に、適切なアプリケーションソフトウェアで処理し、処理されたデータを得ることができる。例えば、取得されたデータを処理する方法は、画像が中断されないシーケンスをプレイバックする、あるいは、リアルタイムで表示する、焦点面における変化および連続として、照射光を示す「ムービー」として表示することができる。

### 【0303】

別の実施形態では、測定および表示用アプリケーションは、通常刺激付与の条件や得られた検出信号の記録条件を設定するためのソフトウェアを含んでいる。この測定および表示用アプリケーションによって、コンピュータは細胞に刺激を付与する手段と、細胞から検出された信号を処理する手段とを構成するだけでなく、光学観察手段（SITカメラ及び画像ファイル装置）および／または細胞培養手段の制御を行うこともできる。

### 【0304】

パラメータ設定画面では、キーボード、タッチパネルまたはマウスなどを用いて画面上で刺激条件を入力することにより、所望の複雑な刺激条件の設定が可能である。その他、細胞培養の温度、pHなどの諸条件の設定をキーボード、マウスなどを用いて行うことができる。

### 【0305】

表示画面では、細胞から検出されたプロファイルまたはそれに由来する情報をリアルタイムでまたは記録後に表示する。また、記録された別のプロファイルまたはそれに由来する情報を細胞の顕微鏡像に重ねて表示することもできる。記録情報の表示とともに、記録時の測定パラメータ（刺激条件、記録条件、表示条件、処理条件、細胞の諸条件、温度、pH等）もまたリアルタイムで表示することができる。温度またはpHが許容範囲を外れたときの警報機能も備えられていてもよい。

### 【0306】

データ解析画面では、種々の数理解析、フーリエ変換、クラスター解析、FFT解析、コヒーレンス解析、コリレーション解析などの条件を設定することが可

能である。一時的なプロフィール表示機能、トポグラフィー表示機能、も備えていてもよい。これらの解析結果は、記録媒体に保存されている顕微鏡像に重ねて表示することができる。

### 【0307】

(遺伝子導入)

本明細書において、核酸分子を細胞に導入する技術は、どのような技術でもよく、例えば、形質転換、形質導入、トランスフェクションなどが挙げられる。本明細書では、トランスフェクションが好ましい。

### 【0308】

本明細書において「トランスフェクション」とは、遺伝子DNA、プラスミドDNA、ウイルスDNA、ウイルスRNAなどを、ウイルス粒子などの形をとらない裸に近い状態で細胞の培養、または細胞の懸濁液に加えて細胞に取り込ませて遺伝子導入または感染を行うことをいう。通常トランスフェクションによって導入された遺伝子は、一過的に細胞において発現するが、永続的に取り込まれる場合もある。

### 【0309】

そのような核酸分子の導入技術は、当該分野において周知であり、かつ、慣用されるものであり、例えば、Ausubel F. A. ら編 (1988)、Current Protocols in Molecular Biology、Wiley、New York、NY；Sambrook J ら (1987) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. およびその第三版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY、別冊実験医学「遺伝子導入&発現解析実験法」羊土社、1997などに記載される。遺伝子の導入は、ノーザンブロット、ウェスタンブロット分析のような本明細書に記載される方法または他の周知慣用技術を用いて確認することができる。

### 【0310】

本明細書において遺伝子操作について言及する場合、「ベクター」または「組

み換えベクター」とは、目的のポリヌクレオチド配列を目的の細胞へと移入させることができるベクターをいう。そのようなベクターとしては、原核細胞、酵母、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、動物個体および植物個体などの宿主細胞において自立複製が可能、または染色体中への組込みが可能で、本発明のポリヌクレオチドの転写に適した位置にプロモーターを含有しているものが例示される。ベクターのうち、クローニングに適したベクターを「クローニングベクター」という。そのようなクローニングベクターは通常、制限酵素部位を複数含むマルチプルクローニング部位を含む。そのような制限酵素部位およびマルチプルクローニング部位は、当該分野において周知であり、当業者は、目的に合わせて適宜選択して使用することができる。そのような技術は、本明細書に記載される文献（例えば、Sambrookら、前出）に記載されている。

#### 【0311】

本明細書において「発現ベクター」とは、構造遺伝子およびその発現を調節するプロモーターに加えて種々の調節エレメントが宿主の細胞中で作動し得る状態で連結されている核酸配列をいう。調節エレメントは、好ましくは、ターミネーター、薬剤耐性遺伝子のような選択マーカーおよび、エンハンサーを含み得る。生物（例えば、動物）の発現ベクターのタイプおよび使用される調節エレメントの種類が、宿主細胞に応じて変わり得ることは、当業者に周知の事項である。

#### 【0312】

原核細胞に対する組換えベクターとしては、p cDNA3 (+)、pBlue script-SK (+/-)、pGEM-T、pEF-BOS、pEGFP、pHAT、pUC18、pFT-DEST<sup>TM</sup>42 GATEWAY (Invitrogen) などが例示される。

#### 【0313】

動物細胞に対する組換えベクターとしては、p cDNA I/Amp、p cDNA I、pCDM8（いずれもフナコシより市販）、pAGE107 [特開平3-229 (Invitrogen)]、pAGE103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、pAMo、pAMoA [J. Biol. Chem., 268, 22782-22787 (1993)]、マウス幹細胞ウイルス

(Murine Stem Cell Virus) (MSCV) に基づいたレトロウイルス型発現ベクター、pEF-BOS、pEGFPなどが例示される。

【0314】

植物細胞に対する組換えベクターとしては、pPCV1CE<sub>n</sub>4HPT、pCGN1548、pCGN1549、pBI221、pBI121などが挙げられるがそれらに限定されない。

【0315】

また、ベクターの導入方法としては、細胞にDNAを導入する上述のような方法であればいずれも用いることができ、例えば、トランスフェクション、形質導入、形質転換など（例えば、リン酸カルシウム法、リボソーム法、DEAEデキストラン法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン（遺伝子銃）を用いる方法など）、リポフェクション法、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriol., 153, 163 (1983)]、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978) 記載の方法が挙げられる。

【0316】

本明細書において「作動可能に連結された(る)」とは、所望の配列の発現（作動）がある転写翻訳調節配列（例えば、プロモーター、エンハンサーなど）または翻訳調節配列の制御下に配置されることをいう。プロモーターが遺伝子に作動可能に連結されるためには、通常、その遺伝子のすぐ上流にプロモーターが配置されるが、必ずしも隣接して配置される必要はない。

【0317】

本明細書において「遺伝子導入試薬」とは、遺伝子導入方法において、導入効率を促進するために用いられる試薬をいう。そのような遺伝子導入試薬としては、例えば、カチオン性高分子、カチオン性脂質、ポリアミン系試薬、ポリイミン系試薬、リン酸カルシウムなどが挙げられるがそれらに限定されない。トランスフェクションの際に利用される試薬の具体例としては、種々なソースから市販されている試薬が挙げられ、例えば、Effectene Transfecti

on Reagent (cat. no. 301425, Qiagen, CA), TransFast™ Transfection Reagent (E2431, Promega, WI), Tfx™-20 Reagent (E2391, Promega, WI), SuperFect Transfection Reagent (301305, Qiagen, CA), PolyFect Transfection Reagent (301105, Qiagen, CA), LipofectAMINE 2000 Reagent (11668-019, Invitrogen corporation, CA), JetPEI (×4) conc. (101-30, Polyplus-transfection, France) および ExGen 500 (R0511, Fermentas Inc., MD) などが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0318】

本明細書において遺伝子発現（たとえば、mRNA発現、ポリペプチド発現）の「検出」または「定量」は、例えば、mRNAの測定および免疫学的測定方法を含む適切な方法を用いて達成され得る。分子生物学的測定方法としては、例えば、ノーザンブロット法、ドットブロット法またはPCR法などが例示される。免疫学的測定方法としては、例えば、方法としては、マイクロタイタープレートを用いるELISA法、RIA法、蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法などが例示される。また、定量方法としては、ELISA法またはRIA法などが例示される。アレイ（例えば、DNAアレイ、プロテインアレイ）を用いた遺伝子解析方法によっても行われ得る。DNAアレイについては、（秀潤社編、細胞工学別冊「DNAマイクロアレイと最新PCR法」）に広く概説されている。プロテインアレイについては、Nat Genet. 2002 Dec ; 32 Suppl : 526-32に詳述されている。遺伝子発現の分析法としては、上述に加えて、RT-PCR、RACE法、SSCP法、免疫沈降法、two-hybridシステム、インビトロ翻訳などが挙げられるがそれらに限定されない。そのようなさらなる分析方法は、例えば、ゲノム解析実験法・中村祐輔ラボ・マニュアル、編集・中村祐輔 羊土社（2002）などに記載されており、本明細書においてそれらの記載はすべて参考として援用される。

## 【0319】

「発現量」とは、目的の細胞などにおいて、ポリペプチドまたはmRNAが発現される量をいう。そのような発現量としては、本発明の抗体を用いてELISA法、RIA法、蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法などの免疫学的測定方法を含む任意の適切な方法により評価される本発明ポリペプチドのタンパク質レベルでの発現量、またはノーザンブロット法、ドットブロット法、PCR法などの分子生物学的測定方法を含む任意の適切な方法により評価される本発明のポリペプチドのmRNAレベルでの発現量が挙げられる。「発現量の変化」とは、上記免疫学的測定方法または分子生物学的測定方法を含む任意の適切な方法により評価される本発明のポリペプチドのタンパク質レベルまたはmRNAレベルでの発現量が増加あるいは減少することを意味する。

## 【0320】

(スクリーニング)

本明細書において「スクリーニング」とは、目的とするある特定の性質をもつ生物または物質などの標的を、特定の操作／評価方法で多数を含む集団の中から選抜することをいう。スクリーニングのために、本発明の方法またはシステムを使用することができる。

## 【0321】

本明細書において、免疫反応を利用してスクリーニングを行うことを、「免疫表現型分類 (immunophenotyping)」ともいう。この場合、本発明の抗体または単鎖抗体は、細胞株および生物学的サンプルの免疫表現型分類のために利用され得る。本発明の遺伝子の転写産物・翻訳産物は、細胞特異的マーカーとして、あるいはより詳細には、特定の細胞型の分化および／または成熟の種々の段階で示差的に発現される細胞マーカーとして有用である。特異的エピトープ、またはエピトープの組み合わせに対して指向されるモノクローナル抗体は、マーカーを発現する細胞集団のスクリーニングを可能とする。種々の技術が、マーカーを発現する細胞集団をスクリーニングするために、モノクローナル抗体を用いて利用され得、そしてその技術には、抗体でコーティングされた磁気ビーズを用いる磁気分離、固体マトリクス（すなわち、プレート）に付着した抗体

を用いる「パニング (panning)」、ならびにフローサイトメトリーが挙げられる (例えば、米国特許第 5,985,660 号; および Morrison ら、Cell, 96:737-49 (1999) を参照)。

#### 【0322】

これらの技術は、ヒト臍帯血において見出され得るような細胞増殖および／または分化を起こし得るかまたは未分化状態への改変処置を行ったような細胞集団のような、未分化の細胞 (例えば、胚性幹細胞、組織幹細胞など) を含む細胞集団についてスクリーニングするために利用され得る。

#### 【0323】

##### (診断)

本明細書において「診断」とは、被検体における疾患、障害、状態などに関連する種々のパラメータを同定し、そのような疾患、障害、状態の現状を判定することをいう。本発明の方法、装置、システムを用いることによって、糖鎖構造を分析し、薬剤耐性レベルと相関付けることができ、そのような情報を用いて、被検体における疾患、障害、状態、投与すべき処置または予防のための処方物または方法などの種々のパラメータを選定することができる。

#### 【0324】

本発明の診断方法は、原則として、身体から出たものを利用することができることから、医師などの医療従事者の手を離れて実施することができることから、産業上有用である。

#### 【0325】

##### (治療)

本明細書において「治療」とは、ある疾患または障害について、そのような状態になった場合に、そのような疾患または障害の悪化を防止、好ましくは、現状維持、より好ましくは、軽減、さらに好ましくは消長させることをいう。

#### 【0326】

本明細書において「被検体」とは、本発明の処置が適用される生物をいい、「患者」ともいわれる。患者または被検体は好ましくは、ヒトであり得る。

#### 【0327】



本明細書において「病因」とは、被検体の疾患、障害または状態（本明細書において、総称して「病変」ともいい、植物では病害ともいう）に関連する因子をいい、例えば、原因となる病原物質（病原因子）、病原体、病変細胞、病原ウイルスなどが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0328】

本発明が対象とする「疾患」は、病原遺伝子に関連する任意の疾患であり得る。そのような疾患としては、癌、ウイルスまたは細菌による感染症、アレルギー、高血圧、高脂血症、糖尿病、心臓病、脳梗塞、痴呆症、肥満、動脈硬化性疾患、不妊症、精神神経疾患、白内障、早老症、紫外線放射線過敏症などが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0329】

本発明が対象とする「障害」は、病原遺伝子に関連する任意の障害であり得る。

#### 【0330】

そのような疾患、障害または状態の具体例としては、例えば、循環器系疾患（貧血（例えば、再生不良性貧血（特に重症再生不良性貧血）、腎性貧血、がん性貧血、二次性貧血、不応性貧血など）、がんまたは腫瘍（例えば、白血病、多発性骨髄腫）など）；神経系疾患（痴呆症、脳卒中およびその後遺症、脳腫瘍、脊髄損傷など）；免疫系疾患（T細胞欠損症、白血病など）；運動器・骨格系疾患（骨折、骨粗鬆症、関節の脱臼、亜脱臼、捻挫、靱帯損傷、変形性関節症、骨肉腫、ユーイング肉腫、骨形成不全症、骨軟骨異形成症など）；皮膚系疾患（無毛症、黒色腫、皮膚悪性リンパ腫、血管肉腫、組織球症、水疱症、膿疱症、皮膚炎、湿疹など）；内分泌系疾患（視床下部・下垂体疾患、甲状腺疾患、副甲状腺（上皮小体）疾患、副腎皮質・髄質疾患、糖代謝異常、脂質代謝異常、タンパク質代謝異常、核酸代謝異常、先天性代謝異常（フェニルケトン尿症、ガラクトース血症、ホモシスチン尿症、メープルシロップ尿症）、無アルブミン血症、アスコルビン酸合成能欠如、高ビリルビン血症、高ビリルビン尿症、カリクレイン欠損、肥満細胞欠損、尿崩症、バソプレッシン分泌異常、侏儒症、ウオルマン病（酸リパーゼ（Acid lipase）欠損症）、ムコ多糖症VI型など）；呼

吸器系疾患（肺疾患（例えば、肺炎、肺がんなど）、気管支疾患、肺がん、気管支がんなど）；消化器系疾患（食道疾患（たとえば、食道がん）、胃・十二指腸疾患（たとえば、胃がん、十二指腸がん）、小腸疾患・大腸疾患（たとえば、大腸ポリープ、結腸がん、直腸がんなど）、胆道疾患、肝臓疾患（たとえば、肝硬変、肝炎（A型、B型、C型、D型、E型など）、劇症肝炎、慢性肝炎、原発性肝がん、アルコール性肝障害、薬物性肝障害）、膵臓疾患（急性膵炎、慢性膵炎、膵臓がん、嚢胞性膵疾患）、腹膜・腹壁・横隔膜疾患（ヘルニアなど）、ヒルシュラング病など）；泌尿器系疾患（腎疾患（腎不全、原発性糸球体疾患、腎血管障害、尿細管機能異常、間質性腎疾患、全身性疾患による腎障害、腎がんなど）、膀胱疾患（膀胱炎、膀胱がんなど）など）；生殖器系疾患（男性生殖器疾患（男性不妊、前立腺肥大症、前立腺がん、精巣がんなど）、女性生殖器疾患（女性不妊、卵巣機能障害、子宮筋腫、子宮腺筋症、子宮がん、子宮内膜症、卵巣がん、絨毛性疾患など）など）；循環器系疾患（心不全、狭心症、心筋梗塞、不整脈、弁膜症、心筋・心膜疾患、先天性心疾患（たとえば、心房中隔欠損、心室中隔欠損、動脈管開存、ファロー四徴）、動脈疾患（たとえば、動脈硬化、動脈瘤）、静脈疾患（たとえば、静脈瘤）、リンパ管疾患（たとえば、リンパ浮腫）など）などが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0331】

本明細書において「がん」または「癌」は、互換可能に用いられ、異型性が強く、増殖が正常細胞より速く、周囲組織に破壊性に浸潤し得あるいは転移をおこし得る悪性腫瘍またはそのような悪性腫瘍が存在する状態をいう。本発明においては、がんは固形がんおよび造血器腫瘍を含むがそれらに限定されない。

#### 【0332】

本明細書において「固形がん」は、固形の形状があるがんをいい、白血病などの造血器腫瘍とは対峙する概念である。そのような固形がんとしては、例えば、乳がん、肝がん、胃がん、肺がん、頭頸部がん、子宮頸部がん、前立腺がん、網膜芽細胞腫、悪性リンパ腫、食道がん、脳腫瘍、骨腫瘍が挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0333】

本明細書において「がん治療」は、抗がん剤（例えば、化学療法剤、放射線治療など）を投与することによって行われるか、または外科的に除去などをする外科的治療を包含する。

#### 【0334】

本明細書において用いられる化学療法剤は、当該分野において周知であり、抗がん剤マニュアル第2版 塚越茂他編 中外医学社；Pharmacology；Lippincott Williams & Wilkins, Inc. に記載されている。そのような化学療法剤は、例えば、以下が挙げられるがそれ限定されない：1）アルキル化剤（DNA、タンパク質などの細胞構成成分をアルキル化して細胞毒性を示す。例えば、シクロホスファミド、ブスルファン、チオテパ、ダカルバジンが挙げられるがそれらに限定されない）；2）代謝拮抗剤（おもに核酸の合成を阻害する薬剤（例えば、葉酸代謝拮抗剤としてメトトレキサートなど、プリン代謝拮抗剤として6-メルカプトプリンなど、ピリミジン代謝拮抗剤としてフルオロウラシル（5-FU）など）；3）DNAトポイソメラーゼ阻害剤（例えば、カンプトテシン、エトポシド（それぞれトポイソメラーゼI、IIを阻害する））；4）チューブリン作用薬（微小管形成を阻害し、細胞分裂を抑制する。ビンブラスチン、ビンクリスチンなど）；5）白金化合物（DNAおよびタンパク質との結合による細胞毒性を示す。シスプラチン、カルボプラチンなど）；6）抗がん抗生物質（DNAと結合し、DNA合成、RNA合成を阻害する。アドリアマイシン、ダウノルビシン、マイトマイシンC、ブレオマイシンなど）；7）ホルモン剤（乳がん、子宮がん、前立腺がんなどホルモン依存性のがんに適応。タモキシフェン、リュープロレリン（LH-RH）など）；8）生物製剤（アスパラギン要求性血液悪性腫瘍に対して有効なアスパラギナーゼ、直接的な抗腫瘍作用と免疫増強による間接作用を示すインターフェロンなどがある）；9）免疫賦活剤（免疫応答能を増強し、間接的に抗腫瘍活性を示す。シイタケ由来の多糖体であるレンチナン、微生物由来のペプチドであるベスタチンなど）。

#### 【0335】

本明細書において「抗がん剤」とは、がん（腫瘍）細胞の増殖を選択的に抑制

し、がんの薬剤および放射線治療の両方を包含する。そのような抗がん剤は当該分野において周知であり、例えば、抗がん剤マニュアル第2版 塚越茂他編 中外医学社; Pharmacology; Lippincott Williams & Wilkins, Inc. に記載されている。

#### 【0336】

本明細書において「放射線療法」または「放射線治療」とは、互換可能に使用され、電離放射線または放射性物質を利用した疾患の治療をいう。代表的な放射線療法としては、X線、 $\gamma$ 線、電子線、陽子線、重粒子線、中性子捕捉療法が挙げられるがそれに限定されない。好ましい放射線療法としては、重粒子線が挙げられる。重粒子線を用いた療法は装置が大きく一般的でないことがある。そのような放射線療法は当該分野において周知であり、例えば、放射線検査と治療の基礎; 放射線治療と集学的治療: 邵啓全(滋賀医大 放射線): 総合消化器ケア 6巻 6号 Page 79-89, 6-7 (2002.02) に記載されている。本発明において同定される薬剤耐性は、通常化学療法が想定されるが、放射線療法による耐性もまたプロフィールと関連付けられることから、本明細書では、放射線療法は薬剤の概念の中に入る。

#### 【0337】

本明細書において「薬学的に受容可能なキャリア」は、医薬または動物薬のような農薬を製造するときに使用される物質であり、有効成分に有害な影響を与えないものをいう。そのような薬学的に受容可能なキャリアとしては、例えば、以下が挙げられるがそれらに限定されない: 抗酸化剤、保存剤、着色料、風味料、および希釈剤、乳化剤、懸濁化剤、溶媒、フィラー、増量剤、緩衝剤、送達ビヒクル、希釈剤、賦形剤および/または農学的もしくは薬学的アジュバント。

#### 【0338】

本発明の処置方法において使用される薬剤の種類および量は、本発明の方法によって得られた情報(例えば、薬剤耐性レベルに関する情報)を元に、使用目的、対象疾患(種類、重篤度など)、患者の年齢、体重、性別、既往歴、投与される被検体の部位の形態または種類などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。本発明の処置方法を被検体(または患者)に対して施す頻度もまた、

使用目的、対象疾患（種類、重篤度など）、患者の年齢、体重、性別、既往歴、および治療経過などを考慮して、当業者が容易に決定することができる。薬剤を投与する頻度あるいは薬剤耐性をモニタリングする頻度としては、例えば、毎日一数ヶ月に1回（例えば、1週間に1回－1ヶ月に1回）の投与が挙げられる。1週間－1ヶ月に1回の投与を、経過を見ながら施すことが好ましい。

#### 【0339】

本明細書において「指示書」は、本発明のテイラーメイド治療方法などを医師、患者など投与を行う人に対して記載したものである。この指示書は、本発明の医薬などを例えば、放射線治療直後または直前（例えば、24時間以内など）に投与することを指示する文言が記載されている。この指示書は、本発明が実施される国の監督官庁（例えば、日本であれば厚生労働省、米国であれば食品医薬品局（FDA）など）が規定した様式に従って作成され、その監督官庁により承認を受けた旨が明記される。指示書は、いわゆる添付文書（package insert）であり、通常は紙媒体で提供されるが、それに限定されず、例えば、電子媒体（例えば、インターネットで提供されるホームページ、電子メール）のような形態でも提供され得る。

#### 【0340】

必要に応じて、本発明の治療では、2種類以上の薬剤が使用され得る。2種類以上の薬剤を使用する場合、類似の性質または由来の物質を使用してもよく、異なる性質または由来の薬剤を使用してもよい。このような2種類以上の薬剤を投与する方法のための薬剤耐性レベルに関する情報も、本発明の方法によって入手することができる。

#### 【0341】

本発明ではまた、得られた薬剤耐性に関する情報を元に、遺伝子治療を施すことも可能である。遺伝子治療とは、発現されたか、または発現可能な核酸の、被験体への投与により行われる治療をいう。本発明のこの実施形態において、核酸は、それらのコードされたタンパク質を産生し、そのタンパク質は治療効果を媒介する。

#### 【0342】

本発明では、いったん類似の種類（例えば、ヒトに対するマウスなど）の生物に関し、ある特定のプロファイルの分析結果と、細胞の状態とが相関付けられた場合、対応するプロファイルの分析結果と、細胞の状態とが相関付けることができることは、当業者は容易に理解する。そのような事項は、例えば、動物培養細胞マニュアル、瀬野ら編著、共立出版、1993年などに記載され支持されており、本明細書においてこのすべての記載を援用する。

#### 【0343】

本発明はまた、遺伝子治療に応用され得る。遺伝子治療とは、発現されたか、または発現可能な核酸の、被験体への投与により行われる治療をいう。本発明のこの実施形態において、核酸は、それらのコードされたタンパク質を産生し、そのタンパク質は治療効果を媒介する。

#### 【0344】

当該分野で利用可能な遺伝子治療のための任意の方法が、本発明に従って使用され得る。例示的な方法は、以下のとおりである。

#### 【0345】

遺伝子治療の方法の一般的な概説については、Goldspielら, *Clinical Pharmacy* 12:488-505 (1993); WuおよびWu, *Biotherapy* 3:87-95 (1991); Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596 (1993); Mulligan, *Science* 260:926-932 (1993); ならびにMorganおよびAnderson, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217 (1993); May, *TIB TECH* 11(5):155-215 (1993)を参照のこと。遺伝子治療において使用される一般的に公知の組換えDNA技術は、Ausubelら(編), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); およびKriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990)に記載される。

## 【0346】

## (基本技術)

本明細書において使用される技術は、そうではないと具体的に指示しない限り、当該分野の技術範囲内にある、マイクロフルイデックス、微細加工、有機化学、生化学、遺伝子工学、分子生物学、微生物学、遺伝学および関連する分野における周知慣用技術を使用する。そのような技術は、例えば、以下に列挙した文献および本明細書において他の場所において引用した文献においても十分に説明されている。

## 【0347】

微細加工については、例えば、Campbell, S. A. (1996). The Science and Engineering of Microelectronic Fabrication, Oxford University Press; Zaut, P. V. (1996). Micromicroarray Fabrication: a Practical Guide to Semiconductor Processing, Semiconductor Services; Madou, M. J. (1997). Fundamentals of Microfabrication, CRC Press; Rai-Choudhury, P. (1997). Handbook of Microlithography, Micromachining, & Microfabrication: Microlithographyなどに記載されており、これらは本明細書において関連する部分が参考として援用される。

## 【0348】

本明細書において用いられる分子生物学的手法、生化学的手法、微生物学的手法は、当該分野において周知であり慣用されるものであり、例えば、Sambrook J. et al. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harborおよびその3rd Ed. (2001); Ausubel, F. M. (1987). Current Protocols in Molecular

Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Ausubel, F. M. (1989). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Innis, M. A. (1990). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press; Ausubel, F. M. (1992). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates; Ausubel, F. M. (1995). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates; Innis, M. A. et al. (1995). PCR Strategies, Academic Press; Ausubel, F. M. (1999). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, and annual updates; Sninsky, J. J. et al. (1999). PCR Applications: Protocols for Functional Genomics, Academic Press、別冊実験医学「遺伝子導入&発現解析実験法」羊土社、1997などに記載されており、これらは本明細書において関連する部分（全部であり得る）が参考として援用される。

【0349】



人工的に合成した遺伝子を作製するためのDNA合成技術および核酸化学については、例えば、Gait, M. J. (1985). Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; Gait, M. J. (1990). Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; Eckstein, F. (1991). Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, IRL Press; Adams, R. L. et al. (1992). The Biochemistry of the Nucleic Acids, Chapman & Hall; Shabarova, Z. et al. (1994). Advanced Organic Chemistry of Nucleic Acids, Weinheim; Blackburn, G. M. et al. (1996). Nucleic Acids in Chemistry and Biology, Oxford University Press; Hermanson, G. T. (1996). Bioconjugate Techniques, Academic Pressなどに記載されており、これらは本明細書において関連する部分が参考として援用される。

### 【0350】

(遺伝子の同時調節の解析)

本明細書において用いられる数理処理は、例えば、生命システム解析のための数学、コロナ社、清水和幸(1999)などにおいて記載される周知技術を適用することができる。以下にそのようなもののなかから代表的な解析手法を説明する。

### 【0351】

1つの実施形態では、そのような数理処理は、回帰分析であり得る。回帰分析としては、線形回帰(単回帰分析法、重回帰分析法、ロバスト推定法などが挙げられる)、非線形推定法などが挙げられるがそれらに限定されない。

### 【0352】

単回帰分析法では、 $n$ 組のデータ  $(x_1, y_1) \sim (x_n, y_n)$  のデータ組を、

$y_i = a x_i + b + e_i$  ( $i = 1, 2, \dots, n$ ) にフィットさせることによって分析が行われる。ここで、 $a$  および  $b$  は、モデルパラメータであり、 $e_i$  は直線からのずれまたは誤差である。ここで、データ点と直接との垂直方向の距離の二乗和の平均値が最小となるように  $a$  および  $b$  を決めるという分析が通常行われる。このような場合、偏微分をして、連立一次方程式を立て、これを解くことによって、二乗誤差を最低にする値が求められる。このような値を、最小二乗推定値という。

## 【0353】

次に、それぞれのデータから平均値を引いた値に対して回帰直接を求める。回帰直線として

$$A \sum_i X_i + B = \sum Y_i$$

というものを想定し、 $B = 0$  を仮定した場合の回帰直線を求めることができる。このとき、 $(x_i, y_i)$  ( $i = 1, 2, \dots, n$ ) の中からそれぞれの平均値 ( $x_{ave}$  および  $y_{ave}$ ) を求め、 $x$  の分散  $s_{xx}$  および  $x$ 、 $y$  の共分散  $s_{xy}$  を求め、次式により回帰直線を求めることができる。

## 【0354】

$$y - y_{ave} = (s_{xy} / s_{xx}) (x - x_{ave})。$$

## 【0355】

ここで、 $r_{xy}$  を相関係数とすると、 $\sum e_i^2 / n = s_{yy} (1 - r_{xy}^2)$  の関係があることから、 $|r_{xy}|$  が 1 に近いほど、誤差は少なく、データは回帰直線でよく表せることを意味する。ここで、 $r_{xy} = s_{xy} / \sqrt{(s_{xy} s_{yy})}$  である。

## 【0356】

別の実施形態において使用される重回帰分析法は、 $y$  が 1 つの独立変数ではなく、2 つまたはそれ以上の変数の関数と考えられ、例えば、

$$y = a_0 + a_1 x_1 + a_2 x_2 + \dots + a_n x_n$$

であらわされるような式で表され、これを重回帰式という。ここで、 $a_0$  などは(偏)回帰係数と呼ばれる。重回帰分析法では、最小二乗法を適用して、正規方程式を解くことによって、重みつき最小二乗推定が求められる。ここでも単回帰分

析と同様の評価を行うことが可能である。

#### 【0357】

別の実施形態において、ロバスト推定法が用いられる。最小二乗法は、測定値に偏りがなく、その測定誤差が正規分布をし、モデルにも近似の誤差がないという前提に基づいている。しかし、ここでは、実際の測定ミス、単純ミスなどがあり得ることから、そのような信頼できないデータを、大多数の信頼できるデータから、アウトライヤー (outlier) として検出して除いたり、または統計処理をすることをロバスト推定法という。このようなロバスト推定法もまた、本発明において利用され得る。

#### 【0358】

非線形推定法もまた本明細書において用いられ得る。このような非線形推定法では、非線形モデルをベクトル方程式として表して解を求めることが可能である。

#### 【0359】

本発明において用いられる数理処理としては、このほかに、主成分分析法、があり、二次元データの主成分分析、多次元データの主成分分析、特異値分解、一般化逆行列を利用する。あるいは、正準相関分析法、因子分析法、判別分析法、クラスター分析法などが利用され得る。

#### 【0360】

(クラスター分析による遺伝子セット分類)

多くの用途に対して、広範な条件にわたって共同で制御される基準転写制御配列のセットを見出すことが所望され得る。このような基準転写制御配列セットを同定する実施形態としては、クラスター化アルゴリズムが挙げられる(クラスター化アルゴリズムの概説は、例えば、Fukunaga、1990、Statistical Pattern Recognition、2nd ed.、Academic Press、San Diego; Anderberg、1973、Cluster Analysis for Applications、Academic Press: New York; Everitt、1974、Cluster Analysis、London: Heinema

nn Educ. Books; Hartigan、1975、Clustering Algorithms、New York: Wiley; Sneath および Sokal、1973、Numerical Taxonomy、Freemanを参照)。

### 【0361】

転写制御配列セットは、転写制御機構に基づいて定義することもできる。調節領域に同一または類似の配列の転写因子結合部位を有している転写制御配列は、共同調節されやすい。ある好ましい実施態様では、目的とする転写制御配列の調節領域を、多重アラインメント分析を用いて比較し、可能な共有転写因子結合部位を解読することができる (Stormo and Hartzell, 1989, Identifying protein binding sites from unaligned DNA fragments, Proc Natl Acad Sci 86:1183-1187; Hertz and Stormo, 1995, Identification of consensus patterns in unaligned DNA and protein sequences: a large-deviation statistical basis for penalizing gaps, Proc of 3rd Intl Conf on Bioinformatics and Genome Research, Lim and Cantor編, World Scientific Publishing Co., Ltd. Singapore, pp. 201-216)。

### 【0362】

種々の条件にわたって共同調節される基本的な生物学的因子のセットを見出すことが所望され得る。これにより、本発明の方法が、効率よくプロファイルに基づく判定において十分に機能するようになる。このような基本的な生物学的因子のセットを同定するための好ましい実施形態はクラスター化アルゴリズムを含むクラスター分析を用いる実施形態において、生物学的サンプルに種々の刺激を施しながら、多数の生物学的因子の状態をモニターすることができる。生物学的

因子の状態の測定を含むデータの表がクラスター分析に用いられる。種々の条件にわたって同時変化する生物学的因子を含む基本生物学的因子セットを得るためには、通常少なくとも2、好ましくは少なくとも3つ、より好ましくは少なくとも10、さらに好ましくは50を超え、最も好ましくは100を超える刺激または条件を用いる。クラスター分析は $m \times k$ 次元を有するデータの表に対して行い、ここで $m$ は条件または刺激の合計数であり、かつ $k$ は測定する生物学的因子の数である。

## 【0363】

多くのクラスター化アルゴリズムがクラスター化分析に有用である。クラスター化アルゴリズムは、クラスターを形成する場合に、対象間の相違点または距離を用いる。ある実施形態においては、用いられる距離は多次元空間におけるユークリッド距離：

## 【0364】

## 【数1】

$$I(x, y) = \left\{ \sum_i (X_i - Y_i)^2 \right\}^{1/2}$$

であり、式中 $I(x, y)$ は遺伝子 $X$ と遺伝子 $Y$ との（または、あらゆる他の細胞構成要素（例えば、生物学的因子） $X$ と $Y$ との）距離であり； $X_i$ および $Y_i$ は刺激 $i$ の下での遺伝子発現応答である。ユークリッド距離を平方してさらに遠隔の対象に徐々に大きくなる重みをかけることができる。その代わりに、距離基準は、例えば生物学的因子 $X$ と生物学的因子 $Y$ との間の、マンハッタン距離であってもよく、これは：

## 【0365】

## 【数2】

$$I(x, y) = \sum_i |X_i - Y_i|$$

によって与えられる。ここでもやはり、 $X_i$ および $Y_i$ は刺激  $i$  の下での生物学的因子または遺伝子発現応答である。他の幾つかの距離の定義は、チェビシェフ距離、パワー距離および不一致率である。次元のデータが自然のままでカテゴリー的である場合、 $I(x, y) = (X_i \neq Y_i \text{ の数}) / i$  として定義される不一致率が本発明の方法において利用され得る。このような方法は、細胞応答に関連して特に有用である、他の有用な距離定義は  $I = 1 - r$  であり、式中  $r$  は応答ベクトル  $X$ 、 $Y$  間の相関係数であって、正規化内積  $X \cdot Y / |X| |Y|$  とも呼ばれる。具体的には、内積  $X \cdot Y$  は式：

【0366】

【数3】

$$X \cdot Y = \sum_i X_i \times Y_i$$

によって定義され、かつ  $|X| = (X \cdot X)^{1/2}$ 、 $|Y| = (Y \cdot Y)^{1/2}$  である。

【0367】

最も好ましくは、距離基準を、例えば、同時変化するおよび／または同時調節される細胞構成要素（同時変化するまたは同時調節される生物学的因子など）を同定するために、問題となっている生物学的問題点に適合させる。例えば、特に好ましい実施形態において、距離は、遺伝子  $X$  および  $Y$  の加重内積を含む相関係数を有する  $I = 1 - r$  を基準とする。具体的には、この好ましい実施形態において、 $r$  は好ましくは以下に示す式：

【0368】

【数4】

$$r = \frac{\sum_i \frac{X_i Y_i}{\sigma_i(X) \sigma_i(Y)}}{\left[ \sum_i \left( \frac{X_i}{\sigma_i(X)} \right)^2 \left( \frac{Y_i}{\sigma_i(Y)} \right)^2 \right]^{1/2}}$$

によって定義される。式中、 $\sigma_i(X)$  および  $\sigma_i(Y)$  は、実験  $i$  における遺伝子  $X$  お

よびYの測定とそれぞれ関連する標準誤差である。

#### 【0369】

上記正規および加重内積の相関係数は、値+1（2つの応答ベクトルが完全に相関し、本質的に同一であることを示す）と-1（2つの応答ベクトルが「相関していない」または「同一方向を向いていない」（すなわち反対を向いている）ことを示す）との間に拘束される。これらの相関係数は、細胞構成要素（例えば、生物学的因子、転写制御配列）セットまたはクラスターが同じ兆候の応答を有する細胞構成要素（例えば、生物学的因子、転写制御配列）を求める本発明の実施形態に特に好ましい。

#### 【0370】

他の実施形態において、同じ生物学的応答または経路を同時調節するかまたはそれに関与しているが、類似しかつ非相関の応答を含む細胞構成要素（例えば、生物学的因子、転写制御配列）のセットまたはクラスターを同定することが好ましい。このような実施形態においては、上述の正規化または加重内積のいずれかの絶対値、すなわち $|r|$ を相関係数として使用することが好ましい。

#### 【0371】

さらに他の実施形態においては、同時調節されるおよび／または同時変化する細胞構成要素（生物学的因子、転写制御配列など）の間の関係はさらに複雑であり、多数の生物学的経路（例えばシグナル伝達経路）が同じ細胞構成要素（例えば、生物学的因子、転写制御配列）に集まり、異なる結果を出すような例がある。そのような実施形態においては、同時変化するおよび／または同時調節される細胞構成要素（変化に関与しないコントロールとしての別の生物学的因子、転写制御配列）を同定することができる、相関係数 $r = r(\text{変化})$ を用いることが好ましい。以下の式（数5）に特定される相関係数は、そのような実施形態において特に有用である：

#### 【0372】

【数5】

$$r = \frac{\sum_i \left| \frac{x_i}{\sigma_i^{(x)}} \right| \left| \frac{y_i}{\sigma_i^{(y)}} \right|}{\left[ \sum_i \left( \frac{x_i}{\sigma_i^{(x)}} \right)^2 \left( \frac{y_i}{\sigma_i^{(y)}} \right)^2 \right]^{1/2}}$$

種々のクラスター連関法則が本発明の方法において有用である。

【0373】

このような方法としては、例えば、単一連関法、最近接点法などが挙げられこれらの方法は、2つの最も近い対象物間の距離を測定する。あるいは、本発明において使用され得る完全連関法は、異なるクラスターにある2つの対象物間の最大距離で距離を測定する。この方法は、遺伝子または他の細胞構成要素が天然に別個の「凝集 (clump)」を形成する場合には特に有用である。

【0374】

あるいは、非加重ペア群の平均が、2つの異なるクラスターにおける対象物ペア全ての間の平均距離として距離を定義する。この方法もまた、天然に別個の「凝集」を形成する遺伝子または他の細胞構成要素をクラスター化するのに非常に有用である。最後に、加重ペア群平均法も利用可能である。この方法は、それぞれのクラスターのサイズを重みとして使用することを除けば非加重ペア群平均法と同じである。この方法は、生物学的因子などのクラスターのサイズが非常に可変すると疑われる実施形態に特に有用である (SneathおよびSokal、1973, Numerical taxonomy, San Francisco: W. H. Freeman & Co.)。他のクラスター連関法則、例えば非加重および加重ペア群セントロイドおよびウード法もまた本発明のいくつかの実施形態に有用である。例えば、Ward, 1963, J. Am. Stat Assn. 58: 236; Hartigan, 1975, Clustering algorithms, New York: Wileyを参照のこと。

【0375】

ある好ましい一つの実施形態において、クラスター分析はhclustの周知



技術（例えば、プログラム S-Plus, MathSoft, Inc., Cambridge, MAからの「hclust」の周知の手順を参照のこと）を用いて行うことができる。

#### 【0376】

クラスター化セットにおける刺激の多様性が大きくなっても、本発明の方法で解析した場合は、通常少なくとも2つ、好ましくは少なくとも3つのプロファイルを解析しただけで、細胞の状態をほぼ解明することができるということが本発明により見出された。このような刺激条件には、異なる濃度での薬剤処理、処理後の異なる測定時間、種々の遺伝子中の遺伝的変異に対する応答、薬剤処理と変異との組合せ、ならびに増殖条件の変化（温度、密度、およびカルシウム濃度など）が含まれる。

#### 【0377】

本明細書において統計学的に「有意に異なる」とは、2つの統計量について言及されるとき、統計的有意性を伴って異なることをいう。本発明の実施形態において、実験のセットを横断する各細胞構成要素の応答に関する実験の見出しを、モンテカルロ法で無作為化することにより、客観的試験を定義することができる。

#### 【0378】

ある実施形態においては、客観的試験を以下の方法で定義することができる：

$p_{ki}$  を、実験  $i$  における構成要素  $k$  の応答とする。 $\Pi(i)$  を実験のインデックスの無作為並べ替えとする。次いで、多数（約100～1000）の異なる無作為並べ替えの各々について、 $p_{k\Pi(i)}$  をたてる。元のツリーの各分枝について、各並べ替えに関して：（1）並べ替えていない元のデータに対して用いたのと同じアルゴリズム（この場合は「hclust」）を用いて階層的クラスター化を行う；

（2）1つのクラスターから2つのクラスターへ移動する際の、クラスター中心に関しての総分散における分別の改善  $f$  を計算する；

#### 【0379】

## 【数 6】

$$f = 1 - \sum D_k^{(1)} / \sum D_k^{(2)}$$

式中、 $D_k$ は、帰属するクラスターの中心に関しての構成要素  $k$  の距離基準（平均）の二乗である。上付の 1 または 2 は、それが全分枝の中心に関するものであるのか、または 2 つのサブクラスターのうちの好適なクラスターの中心に関するものであるのかを示す。このクラスター化法において使用する距離関数  $D$  の定義には、かなりの自由度がある。これらの例においては、 $D = 1 - r$  であり、 $r$  は、実験セットを横断する 1 つの構成要素の応答間の、別の応答に対しての（または平均クラスター応答に対しての）相関係数である。

## 【0380】

詳細には、好ましくは客観的統計学的検定を用いてあらゆるクラスター化法またはアルゴリズムのグループ化決定の統計学的信頼性を判定することができる。好ましくは、同様の検定を、階層的および非階層的クラスター化法の双方に用いることができる。クラスターのコンパクト性は、例えば、「クラスターの平均値」からのクラスターのエレメントの距離の二乗の平均として、またより好ましくは、クラスターの平均値からのエレメントの距離の二乗の平均値の逆数として、定量的に定義される。特定のクラスターのクラスター平均値は、一般に、クラスターの全てのエレメントの応答ベクトルの平均値として定義される。しかし、特定の実施形態（クラスターの平均値に定義が疑わしい場合など）では、例えば、正規化または加重内積の絶対値を用いて、クラスター化アルゴリズムの距離関数（即ち、 $I = 1 - |r|$ ）を評価する。通常、上記の平均値の定義は、応答ベクトルが反対方向を向き、上記に定義するクラスター平均値がゼロになりうる実施形態では問題を包含し得る。従って、このような実施形態では、クラスターのコンパクト性の異なる定義を選択することが好ましく、例えば限定はしないが、クラスター内のエレメントの全てのペア間の距離の二乗の平均値などがある。あるいは、クラスターのコンパクト性は、クラスターの各エレメント（例えば、細胞構成要素）からそのクラスターの他のエレメントまでの平均距離（またはより好ましくは

、平均距離の逆数)を意味すると定義することができる。

#### 【0381】

本発明において用いられる統計的方法においても使用しうるその他の定義は、当業者には明らかである。

#### 【0382】

別の実施形態では、本発明のプロファイルは、信号処理技術を用いて解析することができる。そのような信号処理技術では、相関関数を定義し、相関係数を計算し、自己相関関数および相互相関関数を定義し、これらについて、重み付けの総和が1になるように計算することによって、移動平均を求めることができる。

#### 【0383】

信号処理において、時間領域および周波数領域を考慮することが重要であり得る。自然現象、特に生命および生体の動特性解析において、リズムは重要であることが多い。ここで、ある時間関数  $f(t)$  を考えると、次の条件を満たす関数を周期関数という。

#### 【0384】

$$f(t) = f(t+T)$$

ここで、時間軸上の基準となる点、例えば、時間0の点を基準に考えると、このときの関数の値は  $f(0)$  であり、その後種々の変動を繰り返した後時刻  $T$  の時点で  $f(0)$  と同じ値に戻ることになる。このような関数を周期関数と呼び、このような関数としては、例えば、正弦様波が代表例として挙げられる。ここで、 $T$  を周期と呼ぶ。ここで、 $T$  時間に1回のサイクルを有することをこれは意味するが、単位時間当たりのサイクル数に置き換えて  $1/T$  (サイクル/時間) と表現してもその情報は失われない。このように単位時間当たりのサイクル数で表現される概念は周波数と呼ばれる。ここで周波数を  $f$  としてあらわすと、

$$f = 1/T$$

で表現できる。ここで、時間と周波数とは表裏の関係であり、時間を扱う場合を時間領域を扱うといい、周波数を扱う場合を周波数領域を扱うという。ここでは、電気工学的に周波数を表現することもできる。例えば、周期は、1周期を角度に直して、 $360^\circ$  または  $2\pi$  ラジアンとして表現することが可能である。この

ように表現する場合、 $f$  (サイクル/秒) は  $2\pi$  (ラジアン/秒) となり、これを一般に  $\omega$  ( $=2\pi f$ ) とあらわして、角周波数を呼ぶ。

#### 【0385】

ここで、正弦波と余弦波とを比較すると、余弦波は正弦波に比べて  $90^\circ$  または  $\pi/2$  ラジアン平行移動させたものになる。ここで、正弦波は余弦波の時間遅れとしてあらわすことができ、この時間の遅れを位相 (phase) という。例えば、純粋な余弦波において位相を 0 とすると、正弦波では位相は  $90^\circ$  となる。例えば、正弦波と余弦波とを足したものは、振幅が  $\sqrt{2}$  増え、位相が  $\pi/4$  となる。

#### 【0386】

このような解析において、フーリエ級数および周波数解析の手法が利用され得る。また、フーリエ変換、離散フーリエ変換およびパワースペクトルを利用することも可能である。フーリエ級数展開において、ウェーブレット変換の方法などが利用され得る。このような手法は、当該分野において周知であり、生命システム解析のための数学、コロナ社、清水和幸 (1999)、臨床医学のためのウェーブレット解析、医学出版、石川康宏に記載されている。

#### 【0387】

(好ましい実施形態の説明)

以下に好ましい実施形態の説明を記載するが、この実施形態は本発明の例示であり、本発明の範囲はそのような好ましい実施形態に限定されないことが理解されるべきである。

#### 【0388】

1つの局面において、本発明は、細胞の状態を提示する方法を提供する。このような方法は、a) 上記細胞に由来する生物学的因子群から選択される少なくとも1つの生物学的因子に関連する細胞の状態を経時的にモニターして上記細胞のプロファイルを得る工程；およびb) 上記プロファイルを提示する工程；を包含する。ここでは、例えば、モニターした結果得られる信号強度のプロファイルを区間微分することにより、変化の関数を得、表示することができる。この場合、好ましくは、例えば、構成的プロモーターなどの変化しないと仮定される生物学

的因子を基準に差分を取ることによってそのようなプロファイルを得ることができ、それがそれに限定されない。

#### 【0389】

プロファイルの表示には、どのような方法を用いてもよい。例えば、ディスプレイを用いて視覚的に表示してもよく（例えば、x 軸に時間、y 軸に信号強度）、あるいは、表計算ソフトウェアなどを利用して、数値表として表示してもよい。あるいは、信号強度をある別の光強度としてディスプレイに表示することも可能である。あるいは、プロファイルは、音声によって表示してもよい。

#### 【0390】

好ましくは、細胞は、支持体（好ましくは、固相支持体、例えば、アレイ、プレート、マイクロタイタープレートなど）に固定された状態でモニターされる。そのような固定方法は、当該分野において公知の任意の方法または本明細書において記載される方法に基づいて行うことができる。細胞を固定することによって、検査を系統立てて行うことができる。

#### 【0391】

好ましい実施形態において、このようなプロファイルは、リアルタイムで提示され得る。ここで、リアルタイムは、実質的に同時に表示することができる限り、ある程度のタイムラグが生じててもよい。許容されるタイムラグは、求められるリアルタイムの同時性によるが、例えば、最大で 10 秒であり、より好ましくは最大で 1 秒であり得る。

#### 【0392】

別の局面において、本発明は、細胞の状態を判定する方法を提供する。このような細胞の状態の判定は、転写制御因子の転写状態の変化をプロセスとして観察することから、従来においてはまったく観察されていなかった要素を判断要因に加えることになる。従って、本発明の細胞状態の判定方法は、従来観察することができなかった種々の状態を判定することを可能にする。このような方法は、a) 上記細胞に由来する生物学的因子群から選択される少なくとも 1 つの生物学的因子に関連する転写状態を経時的にモニターして上記細胞のプロファイルを得る工程；および b) 上記転写状態のプロファイルから上記細胞の状態を判定する工

程を包含する。

### 【0393】

好ましくは、細胞は、支持体（好ましくは、固相支持体、例えば、アレイ、プレート、マイクロタイタープレートなど）に固定された状態でモニターされる。そのような固定方法は、当該分野において公知の方法または本明細書において記載される方法に基づいて行うことができる。

### 【0394】

好ましい実施形態において、本発明の細胞状態判定方法では、プロファイルと細胞の状態とを予め関連付ける工程をさらに包含することが有利であり得る。あるいは、そのような関連付けの情報があらかじめ提供されてもよい。そのような関連付けの工程は、判定を行うごとに行ってもよく、データベースとして保存したものをを用いてもよい。

### 【0395】

好ましい実施形態では、使用される生物学的因子は、転写制御配列であってもよく、このような転写制御配列は、例えば、プロモーター、エンハンサー、サイレンサー、他のゲノム構造中構造遺伝子のフランキング配列およびエキソン以外のゲノム配列などであり得るがそれらに限定されない。プロモーターが好ましい。転写状態を直接測定することができるからであり、転写状態は、しばしば、細胞の状態を如実に反映するからである。特定の実施形態では、転写制御配列群は、構成的プロモーター、特異的プロモーターおよび誘導性プロモーターなどであり得る。

### 【0396】

1つの実施形態において、本発明の生物学的因子（例えば、プロモーター）は、どのようなものでもよく、むしろ、種類を選ばないことが特徴である。本発明の方法を用いることにより、プロファイルを「プロセス」という視点で解析することが可能となったことから、任意の生物学的因子（例えば、プロモーター、構造遺伝子など）またはその異種または同種のセットを用いて細胞の状態を判定することが可能になった。そのような判定は、従来の技術では不可能であったことであり、本発明は、従来技術からは達成不可能であったことを達成したという意

味でその有用性は高い。

#### 【0397】

好ましい実施形態では、モニターされる生物学的因子（例えば、転写制御配列）は、少なくとも2つ使用される。少なくとも2つの生物学的因子を観察することによって、通常80%以上（好ましい場合は90%以上、場合によってはほぼ100%）の細胞状態の同定が可能になるからである。より好ましくは、モニターされる生物学的因子は、少なくとも3つの生物学的因子を含む。少なくとも3つの生物学的因子を観察することによって、通常90%以上（好ましい場合は95%以上、場合によってはほぼ100%）の生物学的因子を同定することが可能となるからである。最も好ましい実施形態において、モニターされる生物学的因子は、少なくとも8つの転写制御配列を含む。少なくとも8つの生物学的因子を観察することによって、通常、すべての細胞状態を同定することが可能となるからである。このように、任意の生物学的因子を選択したにもかかわらず、上述のような少ない数のみを選択し、それをモニターすることによって、ほぼすべての細胞の状態を判定することができることは、予想されていなかったことであり、これは、時間点ごとに観察し、それをヘテロな集団として統計処理をした従来の判定方法に比較して、はるかに簡便で精密で正確な判定を提供することになる。

#### 【0398】

従って、本発明の判定方法では、モニターする前に、生物学的因子群から、少なくとも1つの生物学的因子を任意に選択する工程をさらに包含することが好ましい。本発明の1つの重要な特徴は、生物学的因子として、点ごとの調査では特異性を示していないものでも使用可能であるという点にあるからである。また、本発明では、同一環境において線形的に測定されたデータを利用することから、得られるデータが対象となる細胞の状態をより正確に反映することになる。このような精度のデータは、従来技術では取得不可能であったものである。

#### 【0399】

好ましい実施形態において、本発明において得られるプロファイルは、リアルタイムで提示され得る。あるいは、本発明において、データはリアルタイムで得られ得る。本明細書でいう「リアルタイム」は、実質的に同時に表示することが

できる限り、ある程度のタイムラグが生じてもよいことを意味する。許容されるタイムラグは、求められるリアルタイムの同時性によるが、例えば、最大で10秒であり、より好ましくは最大で1秒であり得る。例えば、リアルタイムの診断が必要な治療などでは、そのリアルタイム性は、例えば、最大で30秒であってもよく、それより長い時間であってもよい。

#### 【0400】

好ましい特定の実施形態において、本発明の細胞の状態判定方法で判定される状態としては、例えば、分化状態、未分化状態、外来因子に対する細胞応答、細胞周期および増殖状態などが挙げられる。より詳細には、そのような状態としては、例えば、がん細胞の抗がん剤に対する応答、薬剤耐性、生物時間に対する応答、幹細胞（例えば、間葉系幹細胞、神経幹細胞など）の分化状態、あるいは精製した幹細胞（例えば胚性幹細胞）の未分化状態、細胞形態の変化、細胞の移動状態、分子の細胞内局在化、分泌物質産生能力などが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0401】

好ましい実施形態では、本発明において使用される細胞としては、幹細胞または体細胞あるいはそれらの混合物が挙げられるがそれらに限定されない。あるいは、そのような細胞は、付着細胞、浮遊細胞、組織形成細胞およびそれらの混合物であってもよい。

#### 【0402】

1つの特定の好ましい実施形態では、本発明の細胞状態判定方法は、支持体（好ましくは固体支持体）として基板上に固定された細胞を対象として行うことができる。そのような場合、固相支持体はチップと呼ばれ、細胞が整列して配置される場合はアレイとも呼ばれる。

#### 【0403】

特に好ましい実施形態において、本発明の細胞状態判定方法では、判定に供される生物学的因子（例えば、転写制御配列）が核酸分子である場合、その核酸分子と作動可能に連結されるレポーター遺伝子配列を含む核酸分子という形態で対象となる細胞にトランスフェクトされることが有利である。このような形態を採



用することによって、転写状態がレポーター遺伝子の信号として測定することが可能となるからである。

#### 【0404】

このようなトランスフェクトは、固相上または液相中で行われ得る。ここで、トランスフェクトのために、標的物質の細胞への導入効率を上昇させるための方法が利用され得る。本発明は、通常の条件下では、ほとんど細胞に導入されない標的物質（例えば、DNA、RNA、ポリペプチド、糖鎖またはそれらの複合物質など）を、フィブロネクチンのようなアクチン作用物質とともに細胞に提示する（好ましくは、接触させる）ことによって、その標的物質が効率よく細胞に導入されるという作用を利用する。従って、このトランスフェクション方法は、A）標的物質（すなわち、転写制御配列を含むDNA）を提供する工程；B）アクチン作用物質（例えば、フィブロネクチン）を提供する工程を順不同に包含し、C）該標的物質および該アクチン作用物質を該細胞に接触させる工程をさらに包含する。ここで、標的物質およびアクチン作用物質は、一緒に提供されてもよく、別々に提供されてもよい。アクチン作用物質としては、上述の本発明の標的物質の細胞内への導入の効率を上昇させるための組成物において詳述した形態が適用され得る。そのような形態は、当業者は、本明細書の記載に基づけば、適切な形態を選択し実施することができる。したがって、このようなアクチン作用物質としては、本発明の標的物質の細胞への導入効率を上昇させるための組成物において適用される形態を当業者が任意に選択して本発明を実施することができる。好ましくは、アクチン作用物質は、細胞外マトリクスタンパク質（例えば、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニンなど）またはその改変体であり得る。より好ましくは、フィブロネクチンまたはその改変体もしくはそのフラグメントが使用され得る。

#### 【0405】

1つの実施形態において、本発明において使用される生物学的因子が転写制御配列である場合、その配列は転写因子に結合する能力を有する。そのような転写因子としては、例えば、ISRE、RARE、STAT3、GAS、NFAT、MIC、AP1、SRE、GRE、CRE、NF $\kappa$ B、ERE、TRE、E2F

、Rb、p53などが挙げられるがそれらに限定されない。このような転写因子は、セットとしてBD Biosciences Clontech, CA, USA から市販されているものを利用することができる。ここで、ISREは、STAT1/2と関連し、RAREはレチノイン酸と関連する。STAT3は分化制御に関連し、GREは糖代謝に関連する。CREは、cAMPに関連し、TREは甲状腺ホルモンに関連する。E2Fは細胞周期に関連し、p53はG1チェックポイントに関連する。従って、このような情報を元に、細胞状態を判定することが可能である。

#### 【0406】

好ましい実施形態において、本発明における判定工程は、本発明で得られたプロファイルの位相を比較することを包含する。位相の算出は、本明細書において上述される一般方法、および実施例に記載される方法を参酌して、当業者が適宜行うことができる。

#### 【0407】

別の好ましい実施形態において、本発明における判定工程は、上記細胞のプロファイルとコントロールプロファイルとの差分をとる工程を包含する。差分の算出は、本明細書において上述される一般方法、および実施例に記載される方法を参酌して、当業者が適宜行うことができる。

#### 【0408】

別の好ましい実施形態において、本発明における判定工程は、信号処理法および多変量解析からなる群より選択される数学処理を包含する。このような数学処理は、当業者には周知であり、本明細書の記載を参酌して、容易に実施することができる。

#### 【0409】

別の局面において、本発明は、外来因子と、外来因子に対する細胞の応答とを相関付ける方法を提供する。この方法では、a) 上記細胞を外来因子に曝露する工程；b) 上記細胞に存在する転写制御因子群から選択される少なくとも1つの転写制御因子に関連する転写状態を経時的にモニターして、上記細胞のプロファイルを得る工程；およびc) 上記外来因子と、上記プロファイルとを相関付ける

工程が含まれる。

【0410】

本発明において相関付けがされる外来因子はどのようなものでもよい。そのような外来因子は、細胞に直接または間接的に適用可能であるものが好ましい。外来因子の曝露方法は当該分野において周知であり、その外来因子の種類などによって変動する。物質であれば、その物質を溶媒中に溶解し、その溶液を細胞を含む培地中に滴下することによって曝露が達成される。

【0411】

本発明の相関付けの方法でもまた、プロファイルの生成は、上述のように行うことができる。

【0412】

本発明の相関付けの方法における、外来因子と、プロファイルとの相関付けは、種々の方法を提供して行うことができる。簡便には、ある外来因子が滴下された場合のプロファイルをパターン化し、そのプロファイルからの相違が少ない場合には、その外来因子が滴下されたと推定することができる。

【0413】

好ましくは、細胞は、固相支持体（例えば、アレイ、プレート、マイクロタイタープレートなど）に固定された状態でモニターされる。そのような固定方法は、当該分野において公知の方法または本明細書において記載される方法に基づいて行うことができる。

【0414】

好ましい実施形態において、本発明の相関付け方法では、少なくとも2つの外来因子を使用して、各外来因子に対するプロファイルを得る工程を包含してもよい。このような外来因子は、ある実施形態では、少なくとも3つ、あるいは4つ、より好ましくは、少なくとも10個用いられ得るがそれらに限定されない。

【0415】

特定の実施形態において、本発明の相関付けの方法は、少なくとも2つのプロファイルを類別することにより、該プロファイルに対応する外来因子を類別する工程を包含する。このような類別は、当業者は、本明細書の記載を参酌すれば、

容易に行うことができる。このような類別により、本発明の方法を用いて、未知の外来因子の相関付けおよび同定を達成することができる。

#### 【0416】

好ましい実施形態では、生物学的因子として転写制御配列が使用される場合は、そのような配列は、プロモーター、エンハンサー、サイレンサー、他のゲノム構造中構造遺伝子のフランキング配列およびエキソン以外のゲノム配列などであり得るがそれらに限定されない。プロモーターが好ましい。転写状態を直接測定することができるからである。

#### 【0417】

特定の実施形態では、転写制御配列群は、構成的プロモーター、特異的プロモーターおよび誘導性プロモーターなどであり得る。ここで、プロモーターは、どのようなものでもよく、むしろ、種類を選ばないことが特徴である。本発明の方法を用いることにより、プロファイルを「プロセス」という視点で解析することが可能となったことから、任意のプロモーターまたはそのセットを用いて細胞の状態を判定することが可能になった。そのような判定は、従来の技術では不可能であったことであり、本発明は、従来技術からは達成不可能であったことを達成したという意味でその有用性は高い。

#### 【0418】

好ましい実施形態では、モニターされる生物学的因子（例えば、転写制御配列）は、少なくとも2つ使用される。少なくとも2つの生物学的因子を観察することによって、通常80%以上（好ましい場合は90%以上、場合によってはほぼ100%）の細胞状態の同定が可能になるからである。より好ましくは、モニターされる生物学的因子は、少なくとも3つの生物学的因子を含む。少なくとも3つの生物学的因子を観察することによって、通常90%以上（好ましい場合は95%以上、場合によってはほぼ100%）の生物学的因子を同定することが可能となるからである。最も好ましい実施形態において、モニターされる生物学的因子は、少なくとも8つの転写制御配列を含む。少なくとも8つの生物学的因子を観察することによって、通常、すべての細胞状態を同定することが可能となるからである。このように、任意の生物学的因子を選択したにもかかわらず、上述の

ような少ない数のみを選択し、それをモニターすることによって、ほぼすべての細胞の状態を判定することができることは、予想されていなかったことであり、これは、時間点ごとに観察し、それをヘテロな集団として統計処理をした従来の判定方法に比較して、はるかに簡便で精密で正確な判定を提供することになる。

#### 【0419】

従って、本発明の判定方法では、モニターする前に、生物学的因子群から、少なくとも1つの生物学的因子を任意に選択する工程をさらに包含することが好ましい。本発明の1つの重要な特徴は、生物学的因子として、点ごとの調査では特異性を示していないものでも使用可能であるという点にあるからである。

#### 【0420】

好ましい実施形態において、このようなプロファイルは、リアルタイムで提示され得る。ここで、リアルタイムは、実質的に同時に表示することができる限り、ある程度のタイムラグが生じてよい。許容されるタイムラグは、求められるリアルタイムの同時性によるが、例えば、最大で10秒であり、より好ましくは最大で1秒であり得る。例えば、リアルタイムの外来因子の同定が必要な環境測定などでは、そのリアルタイム性は、例えば、最大で1秒または最大で0.1秒などであってもよい。あるいは、データがリアルタイムで記録媒体に格納された後、格納されたデータに基づいてタイムラグをもってそのデータに対応するプロファイルが提示されてもよい。

#### 【0421】

本発明の相関付けの好ましい実施形態において、工程c)では、外来因子との相関付けに使用される上記プロファイルの情報として、該プロファイルの位相が用いられる。位相は、ある周期における信号強度がプラスおよびマイナスの二種類で表示され、そのように単純化された方法を用いても、細胞を同定あるいは外来因子を同定することができることから、本発明の方法の精密性が実証される。

#### 【0422】

好ましくは、本発明の方法では、細胞は、アレイ上で培養されることが有利である。アレイ上で培養することによって、多数の細胞の観察を一度に行うことができるからである。好ましくは、アレイのような固体支持体上で細胞が固定され

るときは、塩が使用され得る。

#### 【0423】

好ましい実施形態において、細胞の状態の経時的モニターは、上記アレイから画像データを得る工程を包含する。画像データを提供することによって、目視も可能になり、人間（特に、医師などの当業者）の目による判断を得ることが容易になるからである。

#### 【0424】

本発明の好ましい実施形態において、外来因子とプロファイルとを相関付けの工程は、プロファイルの位相の異同を識別することを包含する。位相は上述したように、簡便なパラメータであり、その情報処理が簡便であるからであり、その簡便な情報処理によるのみで、細胞を十分に同定することが可能である。

#### 【0425】

好ましい実施形態において、本発明の方法において同定されるべき外来因子としては、温度変化、湿度変化、電磁波、電位差、可視光線、赤外線、紫外線、X線、化学物質、圧力、重力変化、ガス分圧および浸透圧などが挙げられるがそれらに限定されない。このような因子は、従来の方法では、十分に同定することができなかったが、プロセスを重視した本発明の細胞判定方法を用いることによって、十分に因子の細胞に対する影響を調査することが可能になった。

#### 【0426】

特に好ましい実施形態では、本発明の方法において同定されるべき外来因子は化学物質であり、そのような化学物質としては、生体分子、化学合成物または培地などが挙げられる。

#### 【0427】

このような生体分子としては、例えば、核酸、タンパク質、脂質、糖、プロテオリピッド、リポプロテイン、糖タンパク質およびプロテオグリカンなどが挙げられるがそれらに限定されない。このような生体分子は、生物に対して影響を与えることが公知であるか、未知であってもその可能性が十分に高いことから、調査対象として重要なものであると考えられる。

#### 【0428】

特に好ましくは、細胞に影響を与えることが期待される、ホルモン、サイトカイン、細胞接着因子、細胞外マトリクス、レセプターのアゴニストまたはアンタゴニストなどが調査されるべき生体分子として利用される。

#### 【0429】

別の局面において、本発明は、細胞のプロファイルから、細胞に与えられた未同定の外来因子を推定するための方法を提供する。本発明の方法は、a) 上記細胞を複数の既知の外来因子に曝露する工程；b) 上記細胞に存在する生物学的因子群から選択される少なくとも1つの生物学的因子に関連する転写状態を経時的にモニターして、既知の外来因子の各々に対する上記細胞のプロファイルを得る工程；c) 上記既知の外来因子の各々と、上記プロファイルの各々とを相関付ける工程；d) 上記細胞を未同定の外来因子に曝露する工程；e) 上記選択された生物学的因子に関連する細胞の状態を経時的にモニターして、未同定の外来因子に関する上記細胞のプロファイルを得る工程；f) 上記工程（b）で得られたプロファイルの中から、上記工程（e）で得られたプロファイルに対応するプロファイルを決する工程；およびg) 上記未同定の外来因子は、上記工程（f）において決定されたプロファイルに対応する上記既知の外来因子であることを決定する工程；を包含する。

#### 【0430】

この方法において、外来因子の曝露は、本明細書において上述し、実施例において例示するように行うことができる。プロファイルの生成もまた、本明細書において上述し、実施例において例示するように行うことができる。相関付けもまた、本明細書において上述し、実施例において例示するように行うことができる。このようにして、既知の外来遺伝子に関する情報がそろったところに、未同定の外来因子について同様のモニターを行い、それらを比較して、その未同定の外来因子が既知のものであるかどうかを判定することが可能である。この場合、プロファイルがまったく同じであれば、当然に同じであると判断することが可能であるが、実質的に同じである場合もまた、既知外来因子と判定することが可能である。そのような判定は、その既知の外来因子に関する情報の量および質に依存する。そのような判定の判断は、当業者には容易であり、種々の要素を考慮して

決定することができる。

#### 【0431】

別の局面において、本発明は、細胞のプロファイルから、細胞に与えられた未同定の外来因子を推定するための方法を提供する。このような方法は、a) 上記細胞に存在するプロモーター群から選択される少なくとも1つのプロモーターに関して、既知の外来因子と、上記既知の外来因子に対応する上記細胞のプロファイルとの相関関係に関するデータを提供する工程；b) 上記細胞を未同定の外来因子に曝露する工程；c) 上記選択された生物学的因子に関連する細胞の状態を経時的にモニターして、上記細胞のプロファイルを得る工程；d) 上記工程（a）において提供された、上記プロファイルの中から、上記工程（c）において得られたプロファイルに対応するプロファイルを決める工程；およびe) 上記未同定の外来因子は、上記決定されたプロファイルに対応する上記既知の外来因子であることを決定する工程を包含する。

#### 【0432】

ここで、外来遺伝子の曝露、プロファイル生成、相関付けなどは、本明細書において上述し、実施例において例示するような技術を利用することができる。

#### 【0433】

別の局面において、本発明は、細胞の状態を提示するためのシステムを提供する。このようなシステムは、a) 上記細胞に由来する生物学的因子群から選択される少なくとも1つの生物学的因子に関連する転写状態を経時的にモニターして上記細胞のプロファイルを得る手段；およびb) 上記プロファイルを提示する手段を備える。システム構成例は、図32に示される。

#### 【0434】

本発明の細胞状態提示方法を実行するコンピュータ構成あるいはそれを実現するシステムの例を図17を参照して示す。図17は、本発明の細胞状態提示方法を実行するコンピュータの500の構成例を示す。システム構成例は、図32に示される。

#### 【0435】

コンピュータ500は、入力部501と、CPU502と、出力部503と、



メモリ 504 と、バス 505 とを備える。入力部 501 と、CPU 502 と、出力部 503 と、メモリ 504 とは、バス 505 によって相互に接続されている。入力部 501 と出力部 503 とは入出力装置 506 に接続されている。

#### 【0436】

コンピュータ 500 によって実行される細胞状態提示の処理の概略を説明する。

#### 【0437】

細胞状態提示方法を実行させるプログラム（以下、細胞状態提示プログラムという）は、例えば、メモリ 502 に格納されている。あるいは、細胞状態提示プログラムは、それぞれ独立してあるいは一緒に、フロッピー（登録商標）ディスク、MO、CD-ROM、CD-R、DVD-ROM のような任意のタイプの記録媒体に記録され得る。あるいは、アプリケーションサーバに格納されていてもよい。そのような記録媒体に記録された細胞状態提示プログラムは、入出力装置 506（例えば、ディスクドライブ、ネットワーク（例えば、インターネット））を介してコンピュータ 500 のメモリ 504 にロードされる。CPU 502 が細胞状態提示プログラムを実行することによって、コンピュータ 500 は、本発明の細胞状態提示方法の処理を実行する装置として機能する。

#### 【0438】

入力部 501 を介して、細胞に関する情報などを入力する。また、測定されたプロファイルのデータも入力される。必要に応じて、既知の情報に関する情報も入力してもよい。

#### 【0439】

CPU 502 は、入力部 501 で入力された情報をもとに、プロファイルデータおよび細胞の情報から表示データを生成し、メモリ 504 に表示データを格納する。その後、CPU 502 は、これらの情報をメモリ 504 に格納し得る。その後、出力部 503 は、CPU 502 が選択した細胞の状態を表示データとして出力する。出力されたデータは、入出力装置 506 から出力され得る。

#### 【0440】

別の局面において、本発明は、細胞の状態を判定するシステムを提供する。こ

のようなシステムは、a) 上記細胞に由来する生物学的因子群から選択される少なくとも1つの生物学的因子に関連する転写状態を経時的にモニターして上記細胞のプロファイルを得る手段; およびb) 上記転写状態のプロファイルから上記細胞の状態を判定する手段、を備える。システム構成例は、図32に示される。

#### 【0441】

本発明の細胞状態判定方法を実行するコンピュータ構成あるいはそれを実現するシステムの例を図17を参照して示す。図17は、本発明の細胞状態判定方法を実行するコンピュータの500の構成例を示す。システム構成例は、図32に示される。

#### 【0442】

コンピュータ500は、入力部501と、CPU502と、出力部503と、メモリ504と、バス505とを備える。入力部501と、CPU502と、出力部503と、メモリ504とは、バス505によって相互に接続されている。入力部501と出力部503とは入出力装置506に接続されている。

#### 【0443】

コンピュータ500によって実行される細胞状態判定の処理の概略を説明する。

#### 【0444】

細胞状態判定方法を実行させるプログラム（以下、細胞状態判定プログラムという）は、例えば、メモリ502に格納されている。あるいは、細胞状態判定プログラムは、それぞれ独立してあるいは一緒に、フロッピー（登録商標）ディスク、MO、CD-ROM、CD-R、DVD-ROMのような任意のタイプの記録媒体に記録され得る。あるいは、アプリケーションサーバに格納されていてもよい。そのような記録媒体に記録された細胞状態判定プログラムは、入出力装置506（例えば、ディスクドライブ、ネットワーク（例えば、インターネット））を介してコンピュータ500のメモリ504にロードされる。CPU502が細胞状態判定プログラムを実行することによって、コンピュータ500は、本発明の細胞状態判定方法の処理を実行する装置として機能する。

#### 【0445】

入力部 501 を介して、細胞に関する情報などを入力する。また、測定されたプロファイルのデータも入力される。必要に応じて、既知の情報に関する情報も入力してもよい。

#### 【0446】

CPU 502 は、入力部 501 で入力された情報をもとに、プロファイルデータおよび細胞の情報から細胞の状態を判定し、その結果を判定結果データとして生成し、メモリ 504 に判定結果データを格納する。その後、CPU 502 は、これらの情報をメモリ 504 に格納し得る。その後、出力部 503 は、CPU 502 が選択した細胞の状態を判定結果データとして出力する。出力されたデータは、入出力装置 506 から出力され得る。

#### 【0447】

別の局面において、本発明は、外来因子と、外来因子に対する細胞の応答とを相関付けるためのシステムを提供する。このシステムは、a) 上記細胞を外来因子に曝露する手段；b) 上記細胞に存在するプロモーター群から選択される少なくとも 1 つのプロモーターに関連する転写状態を経時的にモニターして、上記細胞のプロファイルを得る手段；および c) 上記外来因子と、上記プロファイルとを相関付ける手段を備える。このようなシステムもまた、上述のシステムと同様にコンピュータを用いて実現することができる。システム構成例は、図 32 に示される。

#### 【0448】

他の局面において、本発明は、細胞のプロファイルから、細胞に与えられた未同定の外来因子を推定するためのシステムを提供する。このようなシステムは、a) 上記細胞を複数の既知の外来因子に曝露する手段；b) 上記細胞に存在する生物学的因子群から選択される少なくとも 1 つの生物学的因子に関連する細胞の状態を経時的にモニターして、既知の外来因子の各々に対する上記細胞のプロファイルを得る手段；c) 上記既知の外来因子の各々と、上記プロファイルの各々とを相関付ける手段；d) 上記細胞を未同定の外来因子に曝露する手段；e) 上記選択されたプロモーターに関連する転写状態を経時的にモニターして、未同定の外来因子に関する上記細胞のプロファイルを得る手段；f) 上記手段 (b) で

得られたプロファイルの中から、上記手段（e）で得られたプロファイルに対応するプロファイルを決定する手段；および g）上記未同定の外来因子は、上記手段（f）において決定されたプロファイルに対応する上記既知の外来因子であることを決定する手段を備える。このようなシステムもまた、上述のシステムと同様にコンピュータを用いて実現することができる。システム構成例は、図 32 に示される。

#### 【0449】

他の局面において、本発明は、細胞のプロファイルから、細胞に与えられた未同定の外来因子を推定するためのシステムを提供する。このようなシステムは、a）上記細胞に存在する生物学的因子群から選択される少なくとも 1 つのプロモーターに関して、既知の外来因子と、上記既知の外来因子に対応する上記細胞のプロファイルとの相関関係に関するデータを提供する手段；b）上記細胞を未同定の外来因子に曝露する手段；c）上記選択された生物学的因子に関連する細胞の状態を経時的にモニターして、上記細胞のプロファイルを得る手段；d）上記手段（a）において提供された、上記プロファイルの中から、上記手段（c）において得られたプロファイルに対応するプロファイルを決定する手段；および e）上記未同定の外来因子は、上記決定されたプロファイルに対応する上記既知の外来因子であることを決定する手段を備える。このようなシステムもまた、上述のシステムと同様にコンピュータを用いて実現することができる。システム構成例は、図 32 に示される。

#### 【0450】

本発明が上述のようにシステム形態として提供される場合、各々の構成要件は、本発明が方法として提供されるのと同様の詳細なまたは好ましい実施形態を適用して実施することが可能であり、そのような好ましい実施形態の選択は、当業者には容易であり、当業者は、このようなシステムの好ましい実施形態を、本明細書の記載を参酌して容易に行うことができる。システム構成例は、図 32 に示される。

#### 【0451】

別の局面において、本発明は、コンピュータに細胞の状態を提示する処理を実

行させるためのプログラムを記録したコンピュータ読み取り可能な記録媒体を提供する。ここで、この記録媒体には、少なくとも、a) 上記細胞に由来する生物学的因子群から選択される少なくとも1つの生物学的因子に関連する転写状態を経時的にモニターして上記細胞のプロファイルを得る手順；およびb) 上記プロファイルを提示する手順、を実行させるためのプログラムが記録されている。

#### 【0452】

別の局面において、本発明は、コンピュータに、細胞の状態を判定する処理を実行させるためのプログラムを記録したコンピュータ読み取り可能な記録媒体を提供する。このような記録媒体には、少なくともa) 上記細胞に由来する生物学的因子群から選択される少なくとも1つの生物学的因子に関連する転写状態を経時的にモニターして上記細胞のプロファイルを得る手順；およびb) 上記転写状態のプロファイルから上記細胞の状態を判定する手順、を実行させるためのプログラムが記録されている。

#### 【0453】

別の局面において、本発明は、コンピュータに、外来因子と、外来因子に対する細胞の応答とを相関付けるための処理を実行させるためのプログラムを記録したコンピュータ読み取り可能な記録媒体を提供する。この記録媒体には、少なくともa) 上記細胞を外来因子に曝露する手順；b) 上記細胞に存在するプロモーター群から選択される少なくとも1つのプロモーターに関連する転写状態を経時的にモニターして、上記細胞のプロファイルを得る手順；およびc) 上記外来因子と、上記プロファイルとを相関付ける手順、を実行させるためのプログラムが記録されている。

#### 【0454】

他の局面において、本発明は、コンピュータに、細胞のプロファイルから、細胞に与えられた未同定の外来因子を推定するための処理を実行させるためのプログラムを記録したコンピュータ読み取り可能な記録媒体を提供する。この記録媒体には、少なくともa) 上記細胞を複数の既知の外来因子に曝露する手順；b) 上記細胞に存在するプロモーター群から選択される少なくとも1つのプロモーターに関連する転写状態を経時的にモニターして、既知の外来因子の各々に対する

上記細胞のプロファイルを得る手順； c) 上記既知の外来因子の各々と、上記プロファイルの各々とを相関付ける手順； d) 上記細胞を未同定の外来因子に曝露する手順； e) 上記選択されたプロモーターに関連する転写状態を経時的にモニターして、未同定の外来因子に関する上記細胞のプロファイルを得る手順； f) 上記手順（b）で得られたプロファイルの中から、上記手順（e）で得られたプロファイルに対応するプロファイルを決定する手順； および g) 上記未同定の外来因子は、上記手順（f）において決定されたプロファイルに対応する上記既知の外来因子であることを決定する手順、を実行させるためのプログラムが記録されている。

#### 【0455】

他の局面において、本発明は、コンピュータに、細胞のプロファイルから、細胞に与えられた未同定の外来因子を推定するための処理を実行させるためのプログラムを記録したコンピュータ読み取り可能な記録媒体を提供する。この記録媒体には、少なくとも a) 上記細胞に存在するプロモーター群から選択される少なくとも1つのプロモーターに関して、既知の外来因子と、上記既知の外来因子に対応する上記細胞のプロファイルとの相関関係に関するデータを提供する手順； b) 上記細胞を未同定の外来因子に曝露する手順； c) 上記選択されたプロモーターに関連する転写状態を経時的にモニターして、上記細胞のプロファイルを得る手順； d) 上記手順（a）において提供された、上記プロファイルの中から、上記手順（c）において得られたプロファイルに対応するプロファイルを決定する手順； および e) 上記未同定の外来因子は、上記決定されたプロファイルに対応する上記既知の外来因子であることを決定する手順、を実行させるためのプログラムが記録されている。

#### 【0456】

本発明が上述のように記録媒体形態として提供される場合、各々の構成要件は、本発明が方法として提供されるのと同様の詳細なまたは好ましい実施形態を適用して実施することが可能であり、そのような好ましい実施形態の選択は、当業者には容易であり、当業者は、このような記録媒体の好ましい実施形態を、本明細書の記載を参酌して容易に行うことができる。

## 【0457】

別の局面において、本発明は、コンピュータに細胞の状態を提示する処理を実行させるためのプログラムを提供する。ここで、このプログラムは、少なくとも a) 上記細胞に由来する生物学的因子群から選択される少なくとも 1 つの生物学的因子に関連する細胞の状態を経時的にモニターして上記細胞のプロファイルを得る手順；および b) 上記プロファイルを提示する手順、を実行させる。

## 【0458】

別の局面において、本発明は、コンピュータに、細胞の状態を判定する処理を実行させるためのプログラムを提供する。ここで、このプログラムは、少なくとも a) 上記細胞に由来する生物学的因子群から選択される少なくとも 1 つの生物学的因子に関連する転写状態を経時的にモニターして上記細胞のプロファイルを得る手順；および b) 上記転写状態のプロファイルから上記細胞の状態を判定する手順、を実行させる。

## 【0459】

別の局面において、本発明は、コンピュータに、外来因子と、外来因子に対する細胞の応答とを相関付けるための処理を実行させるためのプログラムを提供する。このプログラムは、少なくとも a) 上記細胞を外来因子に曝露する手順；b) 上記細胞に存在するプロモーター群から選択される少なくとも 1 つのプロモーターに関連する転写状態を経時的にモニターして、上記細胞のプロファイルを得る手順；および c) 上記外来因子と、上記プロファイルとを相関付ける手順、を実行させる。このような手順を実行させるための技術は、当該分野において周知であり、その目的に応じて適切なプログラムを当業者は作成することができる。

## 【0460】

他の局面において、本発明は、コンピュータに、細胞のプロファイルから、細胞に与えられた未同定の外来因子を推定するための処理を実行させるためのプログラムを提供する。このプログラムは、少なくとも a) 上記細胞を複数の既知の外来因子に曝露する手順；b) 上記細胞に存在する生物学的因子群から選択される少なくとも 1 つの生物学的因子に関連する細胞の状態を経時的にモニターして、既知の外来因子の各々に対する上記細胞のプロファイルを得る手順；c) 上記

既知の外来因子の各々と、上記プロファイルの各々とを相関付ける手順；d) 上記細胞を未同定の外来因子に曝露する手順；e) 上記選択されたプロモーターに関連する転写状態を経時的にモニターして、未同定の外来因子に関する上記細胞のプロファイルを得る手順；f) 上記手順（b）で得られたプロファイルの中から、上記手順（e）で得られたプロファイルに対応するプロファイルを決定する手順；および g) 上記未同定の外来因子は、上記手順（f）において決定されたプロファイルに対応する上記既知の外来因子であることを決定する手順、を実行させる。

#### 【0461】

他の局面において、本発明は、コンピュータに、細胞のプロファイルから、細胞に与えられた未同定の外来因子を推定するための処理を実行させるためのプログラムを提供する。このプログラムは、少なくとも a) 上記細胞に存在する生物学的因子群から選択される少なくとも 1 つの生物学的因子に関して、既知の外来因子と、上記既知の外来因子に対応する上記細胞のプロファイルとの相関関係に関するデータを提供する手順；b) 上記細胞を未同定の外来因子に曝露する手順；c) 上記選択されたプロモーターに関連する細胞の状態を経時的にモニターして、上記細胞のプロファイルを得る手順；d) 上記手順（a）において提供された、上記プロファイルの中から、上記手順（c）において得られたプロファイルに対応するプロファイルを決定する手順；および e) 上記未同定の外来因子は、上記決定されたプロファイルに対応する上記既知の外来因子であることを決定する手順、を実行させる。

#### 【0462】

本発明が上述のようにプログラム形態として提供される場合、各々の構成要件は、本発明が方法として提供されるのと同様の詳細なまたは好ましい実施形態を適用して実施することが可能であり、そのような好ましい実施形態の選択は、当業者には容易であり、当業者は、このようなプログラムの好ましい実施形態を、本明細書の記載を参酌して容易に行うことができる。そのようなプログラムの記述形式は、当業者には周知であり、例えば、C＋言語などを応用することができる。



## 【0463】

別の局面において、本発明は、被検体を診断する方法およびシステムを提供する。この診断方法は、a) 上記被検体の細胞に由来する生物学的因子群から選択される少なくとも1つの生物学的因子に関連する細胞の状態を経時的にモニターして上記細胞のプロファイルを得る工程；b) 上記状態のプロファイルから上記細胞の状態を判定する工程；およびc) 上記細胞の状態から上記被検体の状態、障害または疾患を判定する工程、を包含する。この診断方法がシステムとして提供される場合、本発明のシステムは、a) 上記被検体の細胞に由来する生物学的因子群から選択される少なくとも1つの生物学的因子に関連する細胞の状態を経時的にモニターして上記細胞のプロファイルを得る手段；b) 上記細胞の状態のプロファイルから上記細胞の状態を判定する手段；およびc) 上記細胞の状態から上記被検体の状態、障害または疾患を判定する手段、を備える。このように、本発明は、細胞の種々の状態、生存、分化、薬剤耐性、適切な抗がん剤の選択、適切な移植細胞の選択などのテーラーメイド診断および治療に応用可能である。好ましくは、本発明の診断方法は、診断結果に応じて選択した治療または予防を被検体に施す工程を包含する治療または予防方法として提供される。別の好ましい実施形態では、本発明の診断システムは、診断結果に応じて選択した治療または予防を提供する手段を備える、治療または予防システムとして提供される。システム構成例は、図32に示される。

## 【0464】

本発明の診断方法または治療方法を実行するコンピュータ構成あるいはそれを実現するシステムの例を図17を参照して示す。図17は、本発明の診断方法を実行するコンピュータの500の構成例を示す。システム構成例は、図32に示される。

## 【0465】

コンピュータ500は、入力部501と、CPU502と、出力部503と、メモリ504と、バス505とを備える。入力部501と、CPU502と、出力部503と、メモリ504とは、バス505によって相互に接続されている。入力部501と出力部503とは入出力装置506に接続されている。

## 【0466】

コンピュータ 500 によって実行される関連付けの処理の概略を説明する。

## 【0467】

関連付け方法および／または処置もしくは予防の選択を実行させるプログラム（以下、それぞれ関連付けプログラムおよび選択プログラムという）は、例えば、メモリ 502 に格納されている。あるいは、関連付けプログラムおよび選択プログラムは、それぞれ独立してあるいは一緒に、フロッピー（登録商標）ディスク、MO、CD-ROM、CD-R、DVD-ROM のような任意のタイプの記録媒体に記録され得る。あるいは、アプリケーションサーバに格納されていてもよい。そのような記録媒体に記録された関連付けプログラムおよび／または選択プログラムは、出入力装置 506（例えば、ディスクドライブ、ネットワーク（例えば、インターネット））を介してコンピュータ 500 のメモリ 504 にロードされる。CPU 502 が関連付けプログラムおよび／または選択プログラムを実行することによって、コンピュータ 500 は、本発明の関連付け方法および／または選択方法の処理を実行する装置として機能する。

## 【0468】

入力部 501 を介して、プロファイルの分析の結果（例えば、位相など）および細胞の状態に関する情報などを入力する。必要に応じて、プロファイルと関連付けられる状態、障害または疾患などの副次的情報、処置および／または予防に関する情報も入力してもよい。

## 【0469】

CPU 502 は、入力部 501 で入力された情報をもとに、プロファイルに関する情報と細胞の状態または被検体の状態、障害または疾患に関する情報、および必要に応じて予防または治療方法とを関連付け、メモリ 504 に関連データを格納する。その後、CPU 502 は、これらの情報をメモリ 504 に格納し得る。その後、出力部 503 は、CPU 502 が選択した細胞の状態に関する情報、被検体の状態、障害または疾患に関する情報、および必要に応じて予防または治療方法などを診断情報として出力する。出力されたデータは、入出力装置 506 から出力され得る。

## 【0470】

(データ生成)

1つの局面において、本発明は、複数の同一環境にある細胞の情報に関するプロフィールデータを生成する方法に関する。この方法は、a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体上に配置する工程；およびb) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして該細胞のプロファイルのデータを生成する工程を包含する。本発明の重要な特徴のひとつは、同一環境にある複数の細胞の情報に関するプロフィールデータを得ることができた点にある。そのような環境を提供する技術もまた、本発明の範囲内にある。同一環境を複数の細胞に提供するために、本発明は、支持体において、例えば、塩のような固定化剤が使用され得る。塩と、正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体と、細胞との組み合わせで支持体に細胞が固定され得る。そのような塩としてはどのようなものでも使用することができ、例えば、塩化カルシウム、リン酸水素ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、ピルビン酸ナトリウム、HEPES、塩化カルシウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫化マグネシウム、硝酸鉄、アミノ酸およびビタミンなどが利用され得るがそれらに限定されない。そのような正に荷電した物質と負に荷電した物質との組み合わせとしては、例えば、DNA、RNA、PNA、ポリペプチド、化学化合物、及びその複合体からなる群より選択される負に荷電した物質と、カチオン性ポリマー、カチオン性脂質、カチオン性ポリアミノ酸及びその複合体からなる群より選択される正に荷電した物質との複合体が挙げられるがそれらに限定されない。本発明において、好ましい実施形態では、対象となる生物学的因子が核酸分子または該核酸分子に由来する分子であり得る。核酸分子は、遺伝情報を司ることが多く、そのような遺伝情報に関し、細胞の情報を得ることができるからである。

## 【0471】

好ましい実施形態において、本発明の方法では、対象となる細胞には、アクチン作用物質が提供されることが好ましい。アクチン作用物質は、細胞内のアクチンに作用し、細胞の内部骨格を変形させて、外部から外来因子を導入することが容易になるという効果を有する。このようなアクチン作用物質の存在により、目

的となる外来因子の細胞内での影響を調べることが可能となる。

#### 【0472】

1つの実施形態において、本発明において対象とされる生物学的因子は、核酸、タンパク質、糖鎖、脂質、低分子、それらの複合分子からなる群より選択される少なくとも1つの因子を含む。

#### 【0473】

好ましい実施形態において、本発明では、対象となる細胞は、モニター前に、ある程度の期間刺激なしで培養することが好ましい。対象となる細胞を同期化するためである。同期化に必要な期間としては、例えば、少なくとも1日間、より好ましくは、少なくとも2日間、さらに好ましくは少なくとも3日間、さらにより好ましくは少なくとも5日間培養することが有利であり得る。ただし、培養が長くなるにつれ、培養条件を維持する必要性が高くなる。同期化は、各細胞に供給される培地が同一であることが好ましいことから、培養中の培地は、常に同一であるか、あるいは、少なくとも同様に変化していることが好ましい。したがって、好ましくは、そのために、培地を対流させる手段を備え、使用してもよい。

#### 【0474】

より好ましい実施形態において、本発明において細胞に提供される生物学的因子は、遺伝子をコードする核酸分子を含み得る。遺伝子をコードする核酸分子は、好ましくは、細胞にトランスフェクトされる。好ましくは、トランスフェクション試薬（遺伝子導入試薬）とともにこのような生物学的因子が提供され得る。さらに好ましくは、遺伝子をコードする核酸分子は、遺伝子導入試薬およびアクチン作用物質とともに細胞に提供され得る。このとき、細胞は、塩と、正に荷電した物質と負に荷電した物質と（ここでは、核酸分子と遺伝子導入試薬と）の複合体とともに提供されることが好ましい。このことにより、細胞および対象となる分子が支持体に固定され、かつ、壁のない状態で別々の生物学的因子（例えば、核酸分子）が細胞内に導入されることが可能となった。壁のない状態で細胞をモニターできることから、実質的に同一の環境下で複数の細胞をモニターすることが可能となる。しかも、異なる生物学的因子を細胞内に導入することもできることから、そのような生物学的因子によって影響を受ける、細胞の状態のプロフ

ファイルを取得することができるようになった。このようなプロファイルは、データとして格納することが可能であり、しかも、そのようなデータは、一定の規格でなされたデータであるから、再現および比較が可能となるという点で、従来の生物学的アッセイで得られた結果とは全く異なる効果を有するといえる。しかも、そのような一定の規格で生成されたデータは、一度格納されると、何度でも多種多様な目的で取り出して使用することができることから、例えば、研究者が種々の解析を行うために、全く同一条件で実質的に無限大の条件の違いを考慮して「仮想実験」を行うことも可能となった。その上、一定の仮想実験および結果が、生の状態を反映した形で格納されていることから、従来、ウェットな仕事でその学生生活の大半をすごさざるを得なかった、生物系の大学生および大学院生が、真の意味でのデータ解析教育を受けることも可能になった。また、このようにして得られた細胞プロファイルデータは、規格化することが容易であるので、世界中で同じ条件で実験を行ったと考えてよいデータをもとに研究を行うことが可能となった。そのようなデータは、規格化された形態で流通されてもよい。そのような規格化された形態は、通常のコンピュータ（例えば、Windows（登録商標）、Mac、UNIX（登録商標）、LINUXなどの通常手に入るOSが装備されたもの）によって読み取り可能な形態であり得る。本発明で生成されるデータは、生成された細胞プロファイルデータ、生成の際に使用した実験条件に関する情報、細胞に関する情報、環境に関する情報などを含み得る。

#### 【0475】

好ましい実施形態において、本発明が対象とするプロファイルは、遺伝子発現のプロファイル、アポトーシスシグナルのプロファイル、ストレスシグナルのプロファイル、分子（好ましくは、蛍光、燐光、放射性物質またはその組み合わせにて標識される）の局在化に関するプロファイル、細胞形態の変化、プロモーターのプロファイル、特定薬剤（例えば、抗生物質、リガンド、毒素、栄養素、ビタミン、ホルモン、サイトカインなど）依存性のプロモーターのプロファイル、分子間相互作用のプロファイルなどを含み得る。ここで、本発明の対象が、特定薬剤依存性のプロモーターのプロファイルを含む実施形態において、本発明は、好ましくはこの特定薬剤を投与するさらに工程を含んでもよい。

## 【0476】

好ましい実施形態において、本発明は、外来刺激が細胞に提供される工程をさらに包含してもよい。このような外来刺激は、生物学的因子であってもよく、そうでなくてもよい。外来因子は、任意の因子であり得、例えば、物質または他の要素（例えば、電離線、放射線、光、音波などのエネルギー）が挙げられるがそれらに限定されない。

## 【0477】

1つの実施形態において、本発明において使用される外来因子は、RNA iを含み得る。RNA iは、実質的に任意の遺伝子の抑制を調べることができることから、存在する遺伝子分だけRNA iを作製してその効果を調べることもできる。RNA iは当該分野において周知の方法によって作製することができる。

## 【0478】

別の実施形態において、本発明において使用される外来因子は、生体に存在しない化学物質を含み得る。このように生体に存在しない化学物質を、細胞に提供することによって、種々の情報を収集することができる。また、一旦収集されたデータは再利用することができることから、生体に存在しない化学物質がほとんど入手不可能な場合であっても、一旦本発明においてデータを取得することができれば、入手可能性を気にすることなく、研究を続けることが可能となる。

## 【0479】

1つの実施形態において、本発明が対象とし得る外来因子は、細胞のレセプターに対するリガンドを含み得る。リガンドを分析することによって、種々のシグナル伝達経路を調査することが可能である。したがって、このような場合、本発明によって得られるプロファイルは、レセプターリガンド相互作用のプロファイルを含む。

## 【0480】

好ましい実施形態において、本発明によって得られるプロファイルは、細胞形態であり、ここで、本発明の方法は、遺伝子の過剰発現、過小発現もしくはノックダウン、外来因子の添加および環境の変化からなる群より選択され得る刺激を細胞に与える工程をさらに含んでいてもよい。

## 【0481】

より好ましい実施形態において、本発明によって得られるプロファイルは、細胞内に存在する分子間の相互作用のプロファイルを含む。このような分子間の相互作用のプロファイルとしては、例えば、シグナル伝達経路において登場する分子と分子との間の相互作用、レセプターとリガンドとの相互作用、転写因子と転写因子配列との相互作用などのプロファイルが挙げられるがそれらに限定されない。

## 【0482】

別の好ましい実施形態では、本発明によって得られるプロファイルは、前記細胞内に存在する分子間の相互作用のプロファイルを含み、ここで、本発明はツーハイブリッド法、FRETおよびBRETからなる群より選択される技術を用いた観察を行う工程をさらに包含する。ここで、ツーハイブリッド法は、分子間相互作用を細胞内において検出する。詳細に関しては、Protein-Protein Interactions, A MOLECULAR CLONING MANUAL, Edited by Erica Golemis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New Yorkに記載されている（この文献は、FRETも記載する）。FRETは、分子間、分子内の共鳴エネルギー移動を蛍光波長の変化として検出するという技術であり、Protein-Protein Interactions、前出、Miyawaki A. Visualization of the spatial and temporal dynamics of intracellular signaling. Dev Cell. 2003 Mar;4(3):295-305. Reviewに説明されている。BRETは、分子間相互作用アッセイシステムであり、Boute N, The use of resonance energy transfer in high-throughput screening: BRET versus FRET. Trends Pharmacol Sci. 2002 Aug;23(8):351-4. Reviewに詳述されている。

## 【0483】

1つの好ましい実施形態において、本発明では、対象となる細胞が、支持体上にアレイ状に配置されていることが好ましい。この場合、好ましくは、本発明において対象となる複数の細胞は、各々が最大10cm、より好ましくは、最大1cm、さらに好ましくは、最大1mmもっとも好ましくは、最大0.1mmの間隔をあけて配置され得る。細胞同士は、最低限の間隔をあけることが必要である

。そのような間隔は、相互作用をしない程度に保つことが好ましい。

#### 【0484】

1つの実施形態において、本発明で得られるプロファイルはリアルタイムに得られてもよいが、得られなくてもよい。リアルタイムで得ることが有利であり得る。同時性が重要である場面ではそのようなリアルタイム性は重要である。あるいは、格納することが目的の場合は、必ずしもリアルタイム性は必要ではない。

#### 【0485】

さらなる実施形態において、本発明は、細胞を固相支持体に固定する工程をさらに包含する。ここで、固体支持体への固定は、塩、複合体、アクチン作用物質などとともに行うことが可能であり得る。

#### 【0486】

1つの実施形態において、本発明によって生成されるデータは、プロファイルに関する情報を含む。好ましい実施形態では、本発明によって生成されるデータは、モニターにおける条件に関する情報、細胞の状態に関する情報、外来因子に関する情報、環境に関する情報などをさらに含んでもよい。

#### 【0487】

好ましい実施形態において、本発明においてモニターされる生物学的因子は、少なくとも2種の生物学的因子を含み、より好ましくは、少なくとも3種の生物学的因子を含み、さらに好ましくは、少なくとも8種の生物学的因子を含み得る。あるいは、ある特定の生物学的因子であれば、そのカテゴリーすべて（例えば、嗅覚レセプター、味覚レセプターであれば、存在するすべてのレセプター）を含むことがもっとも好ましい実施形態であり得る。

#### 【0488】

あるいは、別の好ましい実施形態では、本発明は、このような生物学的因子を任意に選択する工程をさらに包含してもよい。

#### 【0489】

好ましい実施形態では、本発明が対象とする細胞は、幹細胞および体細胞からなる群より選択され得る。

#### 【0490】



1つの実施形態において、本発明において使用される支持体は、固相支持体であることが好ましい。固定することが容易であるからである。そのような固相支持体は、当該分野において公知の任意の物質を材料として使用することができる。ここで、この支持体は、基盤の形態を採っていてもよい。

#### 【0491】

1つの実施形態において、本発明では、生物学的因子は核酸であり、この細胞は、該核酸でトランスフェクトされることが有利である。このように核酸でトランスフェクトすることによって、その核酸が細胞に与える影響をリアルタイムであるいは規定化された格納可能な様式でデータとしてプロフィールを収集することが可能となる。このようなことは、従来技術では実現不可能であった。好ましい実施形態では、このトランスフェクトは固相上または液相中で行われ得る。より好ましくは、このトランスフェクトは固相上で行われることが有利である。データ収集および規格化がより容易であるからである。

#### 【0492】

本発明の好ましい実施形態では、プロフィールの処理は、位相の比較、コントロールプロフィールとの差分計算、信号処理法および多変量解析からなる群より選択される処理により処理され得る。そのように処理されたデータもまた、本発明の範囲内にある。

#### 【0493】

別の局面において、本発明は、複数の同一環境にある細胞の情報に関するプロフィールデータを提示方法を提供する。この方法は、a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体上に配置する工程；b) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして該細胞のプロフィールのデータを生成する工程；およびc) 該データを提示する工程、を包含する。

#### 【0494】

ここで、複数の細胞を同一環境に保つことができる支持体は、本明細書において別に詳述したとおりに実施することができる。データを生成する工程もまた、本明細書において別に詳述したとおりに実施することができる。データを提示する工程もまた、本明細書において別に詳述したとおりに実施することができる。

そのような提示方法としては、例えば、視覚的、聴覚的、嗅覚的、触覚的、味覚的など種々の感覚手段を利用する方法が挙げられるがそれらに限定されない。好ましくは、視覚的な提示手段が利用される。例えば、コンピュータのディスプレイなどが例示され得る。

#### 【0495】

好ましくは、本発明の提示方法では、提示はリアルタイムで行われ得る。あるいは、格納されたデータを呼び出して遅れて提示されてもよい。リアルタイムで提示が行われるべき場合は、データ信号が直接例えばディスプレイに送信され得る。

#### 【0496】

別の局面において、本発明は、同一環境にある細胞の状態を判定する方法を提供する。ここで、この方法は、a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体上に配置する工程；b) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして該細胞のプロファイルのデータを生成する工程；およびc) 該データから該細胞の状態を判定する工程、を包含する。

#### 【0497】

ここで、複数の細胞を同一環境に保つことができる支持体は、本明細書において別に詳述したとおりに実施することができる。データを生成する工程もまた、本明細書において別に詳述したとおりに実施することができる。細胞の状態を判定する工程は、例えば、生成されたデータと、細胞に関する情報とを相関付けるか、あるいは、標準的なデータと比較することなどによって判定を行うことができる。この場合、統計学的処理が行われてもよい。

#### 【0498】

したがって、ある実施形態において、本発明は、本発明によって得られるプロファイルと細胞の状態とを予め相関付ける工程をさらに包含する。判定を円滑に行うためには、好ましくは、本発明において対象とする細胞は、状態が既知の細胞を含むことが有利である。状態が既知の細胞に関するデータをすでに保持することが可能であることから、その既知細胞と未知細胞とのデータ比較により、判定を迅速に行うことが可能となるからである。

## 【0499】

判定の際には、好ましくは、対象となる生物学的因子は、少なくとも2種存在することが有利である。そのような生物学的因子が複数存在するとき、生物学的因子は、異種カテゴリー（例えば、タンパク質および核酸など）であってもよく、同種カテゴリーであってもよい。

## 【0500】

好ましくは、本発明は、生物学的因子を任意に選択する工程をさらに包含する。どのような生物学的因子を選択しても、細胞の状態は、ある程度特著付けることができ、場合によっては同定することも可能であることから、本発明は、従来技術からは想像もつかない効果を奏するといえる。

## 【0501】

ここで、本発明の判定方法では、好ましくは、データは、リアルタイムで生成される。データがリアルタイムで生成されることにより、未知物質または状態が未知の細胞の判定がリアルタイムで行われ得るからである。

## 【0502】

ここで、本発明の判定方法において、対象とされる細胞の状態としては、分化状態、未分化状態、外来因子に対する細胞応答、細胞周期および増殖状態などが挙げられるが、それらに限定されない。

## 【0503】

本発明において対象とされる細胞は、幹細胞であっても体細胞であってもよい。体細胞は、どのような細胞であってもよい。細胞の選択は、細胞を使う目的によって当業者が適宜選択することができる。

## 【0504】

本発明の判定方法で用いられる固相支持体は、基板を含む。基板とすることで、本発明は、コンピュータシステムの一部としてその基板を使用し、自動的に判定を行うことが可能となる。システム構成例は、図32に示される。

## 【0505】

好ましい実施形態において、本発明の判定方法では、生物学的因子は核酸分子であり、前記細胞は該核酸分子でトランスフェクトされる、請求項52に記載の

方法。ここで、トランスフェクション技術は、どのような物を利用してもよいが、好ましくは、遺伝子導入試薬を用いることが有利である。さらに好ましくは、塩、アクチン作用物質などを用いて固相支持体上でトランスフェクトされることが好ましい。トランスフェクトは固相上で行われても液相中で行われてもよいが、好ましくは固相上で行われ得ることが有利である。

#### 【0506】

本発明の判定方法では、対象とする生物学的因子は、別の生物学的因子に結合する能力を有するものであってもよい。このような性質を持っている生物学的因子を調べることによって、細胞中のネットワーク機構が解明され得るからである。

#### 【0507】

本発明の判定方法でもまた、判定工程は、プロファイルの位相の比較、コントロールプロファイルとの差分収集、信号処理法および多変量解析からなる群より選択される数学処理を行うことを包含し得る。このような処理方法は、当該分野において周知であり、本明細書において詳細に説明されている。

#### 【0508】

別の局面において、本発明は、外来因子と、該外来因子に対する細胞の応答とを相関付ける方法を提供する。ここで、この方法は、a) 細胞を、複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体上で、外来因子に曝露する工程；b) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして該細胞のプロファイルのデータを生成する工程；およびc) 該外来因子と、該プロファイルとを相関付ける工程；包含する。ここで、外来因子への曝露は、細胞と外来因子とを接触する環境に配置することによって達成される。例えば、細胞が支持体上に固定されているとき、その支持体上にその外来因子を加えることによって、曝露が達成され得る。データの生成および相関付けの方法もまた、当該分野において周知であり、そのような生成および相関付けの方法として、通常のデータ処理を用いるかそれを組み合わせて使用することができる。統計学的処理を行い、統計学的に有意なデータおよび情報を生成することが好ましい。

#### 【0509】

好ましい実施形態において、本発明の相関付け方法では、細胞は、支持体に固定されていてもよい。固定されることによって、データの規格化が容易になり、データ処理が格段に効率化される。

#### 【0510】

好ましい実施形態において、本発明の相関付け方法では、少なくとも2つの前記外来因子を使用して、各外来因子に対するプロファイルを得る工程をさらに包含し得る。このようなプロファイルを得る技術は、本明細書において十分に説明されている。

#### 【0511】

より好ましくは、相関付けは、少なくとも2つのプロファイルを類別することにより、該プロファイルに対応する外来因子を類別する工程をさらに包含してもよい。類別化することによって、より規格化されたデータ処理が可能となる。

#### 【0512】

好ましい実施形態では、本発明において得られるプロファイルはリアルタイムで提示されるが、データの格納を目的とする場合は、特にリアルタイムでなくてもよい。

#### 【0513】

好ましい実施形態では、本発明において使用される細胞は、アレイ上で培養され得る。したがって、そのような場合、細胞は培地で覆われていることが好ましい。培地としては、通常細胞に使用する培地であればどのような培地でも使用され得る。

#### 【0514】

本発明の好ましい実施形態では、プロファイルのモニターは、前記アレイから画像データを得ることを包含する。特に、プロファイルが、視覚情報（例えば、遺伝子発現による蛍光の発光）である場合は、画像データを得ることによって、プロファイルを得ることが可能になるからである。

#### 【0515】

本発明の相関付け方法では、外来因子とプロファイルとを相関付ける工程は、前記プロファイルの位相の異同を識別する工程を包含し得る。位相の異動の判別

は、本発明がプロファイルを初めて経時的に、かつ、同一環境で提供することによって達成される特徴である。

#### 【0516】

本発明が対象とする外来因子は、温度変化、湿度変化、電磁波、電位差、可視光線、赤外線、紫外線、X線、化学物質、圧力、重力変化、ガス分圧および浸透圧からなる群から選択され得る。好ましくは、化学物質は、生体分子、化学合成物または培地であり得る。そのような生体分子としては、例えば、核酸分子、タンパク質、脂質、糖、プロテオリピッド、リポプロテイン、糖タンパク質およびプロテオグリカンなどが挙げられるがそれらに限定されない。生体分子はまた、例えば、ホルモン、サイトカイン、細胞接着因子および細胞外マトリクスなどであってもよい。あるいは、化学物質は、レセプターのアゴニストまたはアンタゴニストであってもよい。

#### 【0517】

別の局面において、本発明は、細胞のプロファイルから、細胞に与えられた未同定の外来因子を同定するための方法に関する。この方法は、a) 細胞に、同一環境を保つことができる支持体上で、複数の既知の外来因子を曝露する工程；b) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターし、既知の外来因子の各々に対する該細胞のプロファイルを得て該細胞のプロファイルのデータを生成する工程；c) 該既知の外来因子の各々と、該プロファイルの各々とを相関付ける工程；d) 該細胞を未同定の外来因子に曝露する工程；e) 外来因子に曝露された該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして、未同定の外来因子に関する該細胞のプロファイルを得る工程；f) 該工程（b）で得られたプロファイルの中から、該工程（e）で得られたプロファイルに対応するプロファイルを決定する工程；およびg) 該未同定の外来因子は、該工程（f）において決定されたプロファイルに対応する該既知の外来因子であることを決定する工程；を包含する。ここで、外来因子の曝露、データ生成、相関付け、未同定の外来因子の曝露などは、本明細書において他の場所において詳述されており、当業者はこれらの記述を参照して、目的に応じて適宜適切な形態を選択することができる。

## 【0518】

別の局面において、本発明は、細胞のプロファイルから、細胞に与えられた未同定の外来因子を同定するための方法を提供する。この方法は、a) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体に関し、既知の外来因子と、該既知の外来因子に対応する該細胞のプロファイルとの相関関係に関するデータを提供する工程；b) 該細胞を未同定の外来因子に曝露する工程；c) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして、該細胞のプロファイルを得る工程；d) 該工程（a）において提供された、該プロファイルの中から、該工程（c）において得られたプロファイルに対応するプロファイルを決定する工程；およびe) 該未同定の外来因子は、該決定されたプロファイルに対応する該既知の外来因子であることを決定する工程；を包含する。ここで、外来因子の曝露、データ生成、相関付け、未同定の外来因子の曝露などは、本明細書において他の場所において詳述されており、当業者はこれらの記述を参照して、目的に応じて適宜適切な形態を選択することができる。

## 【0519】

別の局面において、本発明は、複数の同一環境にある細胞の情報に関するプロファイルを得る方法を提供する。この方法は、a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体上に配置する工程；およびb) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして該細胞のプロファイルを得る工程、を包含する。ここで、外来因子の曝露、データ生成、相関付け、未同定の外来因子の曝露などは、本明細書において他の場所において詳述されており、当業者はこれらの記述を参照して、目的に応じて適宜適切な形態を選択することができる。

## 【0520】

別の局面において、本発明は、本発明の細胞プロファイルデータを生成する方法によって生成されたデータが格納される記録媒体に関する。格納形式はどのようなものであってもよく、記録媒体もまた、どのような媒体であってもよい。例えば、そのような記録媒体としては、CD-ROM、フレキシブルディスク、CD-R、CD-RW、MO、ミニディスク、DVD-ROM、DVD-R、メモ

リースティック、ハードディスクなどが挙げられるがそれらに限定されない。本発明はまた、本発明の細胞プロファイルデータを生成する方法によって生成されたデータが格納される伝送媒体に関する。伝送媒体としては、例えば、イントラネット、インターネットなどのネットワークが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0521】

本発明の記録媒体または伝送媒体は、前記モニターにおける条件に関する情報、前記プロファイルに関する情報、前記細胞の状態に関する情報および前記生物学的因子に関する情報からなる群より選択される、少なくとも1つの情報に関するデータをさらに含んでもよい。このような情報に関するデータは、相互にリンクされた形態で格納されてもよい。好ましくは、これらのデータは規格化されることが有利である。規格化されることによって、一定の流通経路に載せることが可能になるからである。上記リンクは各々の細胞ごとにリンクされるか、あるいは生物学的因子ごとにリンクされるか、あるいはその両方であってもよい。

#### 【0522】

別の局面において、本発明は、本発明の細胞プロファイルデータを生成する方法によって生成されたデータに関する。このようなデータは、従来の技術では生成し得なかったデータであることから、全く新規であるといえる。

#### 【0523】

別の局面において、本発明は、同一環境にある複数の細胞の情報に関するプロファイルデータを生成するシステムを提供する。このシステムは、a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体；b) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターする手段；およびc) 該モニター手段から得られた信号から該細胞のプロファイルのデータを生成する手段；を備える。同一環境に保つことができる支持体は、本発明によって初めて提供された技術を用いて当業者が実施することができる。そのような技術とは、細胞を固定化し、壁のない状態で細胞を配列することができることに起因する。モニター手段としては、例えば、顕微鏡（例えば、光学顕微鏡、蛍光顕微鏡、位相差顕微鏡など）、電子顕微鏡、スキャナー、肉眼、赤外線カメラ、共焦点・非共焦点顕微鏡



、CCDカメラ、などが挙げられるがそれらに限定されない。システム構成例は、図32に示される。

#### 【0524】

本発明のシステムは、システムとして実施されるときには、細胞を最初から含んでいる必要はないが、好ましくは、複数の細胞が含まれており、かつ、支持体に固定されていることが有利である。そのような場合、固定は、規格化されていることが好ましい。また、固定される場合、細胞間の距離としては、例えば、1 mmなどが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0525】

好ましい実施形態では、支持体には、塩およびアクチン作用物質からなる群より選択される少なくとも1つの物質が付着されることが好ましい。このように塩およびアクチン作用物質のいずれか、好ましくは両方が付着されることによって、固定および／または細胞内物質導入の効果が増強されるからである。

#### 【0526】

本発明のシステムにおいて使用され得るモニター手段としては、光学顕微鏡、蛍光顕微鏡、位相顕微鏡、レーザー光源を用いた読取装置、表面プラズモン共鳴（SPR）イメージング、電気信号、化学的または生化学的マーカーのいずれかあるいは複数種を用いる手段、放射光、共焦点顕微鏡、非共焦点顕微鏡、微分干渉顕微鏡、実体顕微鏡、ビデオモニターおよび赤外線カメラなどが挙げられるがそれらに限定されない。好ましくは、スキャナー、例えば、白色光源もしくはレーザーによって基盤表面をスキャンするスキャナーを使用する。スキャナーが好ましいのは、蛍光であれば励起エネルギーを効率よく伝達すること、顕微鏡技術を流用することが容易であるという利点があるからである。さらに、細胞に対して大きなダメージを与えることなく測定できるという利点を有するからである。システム構成例は、図32に示される。

#### 【0527】

別の局面において、本発明は、複数の同一環境にある細胞の情報に関するプロフィールを提示するシステムを提供する。このシステムは、a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体；b) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子

またはその集合体を経時的にモニターする手段；c) 該モニター手段から得られた信号から該細胞のプロファイルのデータを生成する手段；およびd) 該データを提示する手段、を包含する。ここで、支持体、モニター手段、データ生成手段については、本明細書において他の場所に記載されるように実施することができる。データを提示する手段もまた、当該分野において周知の手段を利用することができる。そのようなデータ提示手段としては、コンピュータのディスプレイ、スピーカなどが挙げられるがそれらに限定されない。システム構成例は、図32に示される。

#### 【0528】

本発明の提示システムは、複数の細胞をさらに含み、該複数の細胞は前記支持体に固定されるていることが好ましい。このような場合、支持体には、塩およびアクチン作用物質からなる群より選択される少なくとも1つの物質が付着される。このような物質が使用されることによって、固定が強化され、および／または外来物質の細胞内導入が増強されるからである。

#### 【0529】

モニター手段は、どのようなものであってもよく、例えば、光学顕微鏡、蛍光顕微鏡、位相顕微鏡、レーザー光源を用いた読取装置、表面プラズモン共鳴（SPR）イメージング、電気信号、化学的または生化学的マーカーのいずれかあるいは複数種を用いる手段などであり得る。

#### 【0530】

データ提示手段は、どのようなものであってもよく、例えば、ディスプレイ、スピーカなどが挙げられる。

#### 【0531】

別の局面において、本発明は、細胞の状態を判定するシステムを提供する。このシステムは、a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体；b) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターする手段；c) 該モニター手段から得られた信号からデータを生成する手段；およびd) 該データから該細胞の状態を外挿する手段、を備える。ここで、支持体、モニター手段およびデータ生成手段は、本明細書において他の場所において記載した

ように当業者は実施することができる。データから細胞の状態を外挿する手段もまた、当該分野において周知の技術を用いて作製し、使用することができる。例えば、測定されたデータと、既知の細胞に関する標準データとを比較することによって外挿が達成され、そのような外挿のためのプログラムを格納したデバイスまたはそれを実行することができるコンピュータをそのような外挿手段として使用することができる。システム構成例は、図 32 に示される。

### 【0532】

別の局面において、本発明は、外来因子と、該外来因子に対する細胞の応答とを相関付けるシステムを提供する。このシステムは、a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体；b) 外来因子を曝露する手段；c) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターする手段；d) 該モニター手段からの信号から、該細胞のプロファイルのデータを生成する工程；および e) 該外来因子と、該プロファイルとを相関付ける手段；を備える。ここで、支持体、モニター手段、データ生成手段は本明細書において他の場所において説明したように実施することができる。外来因子を曝露する手段もまた、その外来因子の性質に応じて当業者が適宜設計し、実施することができる。相関付けの手段もまた、その相関付けのためのプログラムを格納した記録媒体またはそれを実行することができるコンピュータを利用することができる。好ましくは、本発明のシステムは、複数の細胞を含む。システム構成例は、図 32 に示される。

### 【0533】

別の局面において、本発明は、細胞のプロファイルから、細胞に与えられた未同定の外来因子を同定するためのシステムを提供する。このシステムは、a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体；b) 既知の外来因子を曝露する手段；c) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターする手段；d) 外来因子の各々に対する該細胞のプロファイルを得て該細胞のプロファイルのデータを生成する手段；e) 該既知の外来因子の各々と、該プロファイルの各々とを相関付ける手段；f) 該細胞を未同定の外来因子に曝露する手段；g) 該手段 (d) で得られた既知の外来因子のプロファイルと、未

知の外来因子のプロファイルとを比較し、既知の外来因子のプロファイルの中から、未知の外来因子のプロファイルに対応するプロファイルを決断する手段であって、該決断された未同定の外来因子は、該決断されたプロファイルに対応する該既知の外来因子である、手段、を備える。ここで、支持体、曝露手段、モニター手段、データ生成手段。相関付け手段、別の曝露手段は、本明細書における他の場所の記載を参酌して、当業者は適宜適切な携帯で実施することができる。また、対応するプロファイルを決断する手段もまた、そのような決断プロセスを実行するプログラムを格納した記録媒体とそのプログラムを実行するコンピュータとを利用することなどによって、実施することができる。好ましくは、このシステムは、複数の細胞を含む。システム構成例は、図 32 に示される。

#### 【0534】

別の局面において、本発明は、細胞のプロファイルから、細胞に与えられた未同定の外来因子を同定するためのシステムを提供する。このシステムは、a) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体に関し、既知の外来因子と、該既知の外来因子に対応する該細胞のプロファイルとの相関関係に関するデータが格納された記録媒体；b) 該細胞を未同定の外来因子に曝露する手段；c) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体；d) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターする手段；e) 該モニター手段から得られた信号から、該細胞のプロファイルを得る手段；f) 該記録媒体 (a) において格納される該プロファイルの中から、未知の外来因子に関して得られたプロファイルに対応するプロファイルを決断する手段であって、該未同定の外来因子は、該決断されたプロファイルに対応する該既知の外来因子である、手段；を備える。ここで、支持体、曝露手段、モニター手段、データ生成手段。相関付け手段、別の曝露手段は、本明細書における他の場所の記載を参酌して、当業者は適宜適切な携帯で実施することができる。また、対応するプロファイルを決断する手段もまた、そのような決断プロセスを実行するプログラムを格納した記録媒体とそのプログラムを実行するコンピュータとを利用することなどによって、実施することができる。好ましくは、このシステムは、複数の細胞を含む。システム構成例は、図 32 に示される。

## 【0535】

別の局面において、本発明は、複数の細胞の環境を同一に維持することができる支持体に関する。このような支持体は、本発明によって始めて提供された。このような支持体を利用することによって、複数の細胞の同一環境下での分析が可能になった。

## 【0536】

好ましくは、支持体上の細胞は、アレイ状に配置されていることが有利である。規格化された分析が可能となるからである。この場合、塩またはアクチン作用物質を含むことが好ましい。より好ましくは、正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体を含むことが有利である。細胞の固定が容易になるからである。アクチン作用物質は、細胞への外来因子の導入効率を上げることから特に内部を分析する際に好ましい。したがって、本発明の好ましい実施形態では、塩およびアクチン作用物質を含み、さらに正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体を含むことがさらに好ましい。

## 【0537】

本発明の支持体は、細胞が1mmの間隔で配置され得るという特徴を有する。このような間隔で、壁のない環境を提示することは、従来不可能であった。したがって、本発明は、驚くべき効果および実用性を有するものである。

## 【0538】

好ましい実施形態では、本発明の支持体は、固定された細胞をさらに含んで提供される。より好ましい実施形態では、本発明の支持体は、固定された生物学的因子をさらに含んで提供される。

## 【0539】

好ましい実施形態では、上記生物学的因子は2種類以上固定される。このような生物学的因子は、核酸分子、タンパク質、糖、脂肪、代謝物、低分子、それらの複合体、ならびに物理的要素および／または時間的要素が入った因子からなる群より選択される因子であってもよい。

## 【0540】

より好ましい実施形態において、本発明の支持体には、細胞および生物学的因

子が混合して固定される。生物学的因子と細胞とは、ここでは、。相互作用するように配置され得る。そのような相互作用は、生物学的因子によって変動するが、当業者はその性質を見れば、どのように相互作用するかおよびどのように配置すれば相互作用するかを理解することができる。

#### 【0541】

好ましい実施形態にひとつにおいて、本発明の支持体には、塩および正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体と、アクチン作用物質とが、細胞および生物学的因子とともに固定される。

#### 【0542】

より好ましい実施形態では、本発明の支持体には、塩および正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体と、アクチン作用物質とが、細胞および生物学的因子とともにアレイ状に固定される。このような構成をとることによって、細胞プロファイルデータを生成することができる、細胞チップが提供される。この支持体は、好ましくは、塩と、遺伝子導入試薬と、アクチン作用物質と、核酸分子と、細胞とがアレイ状に固定されるという構成を採り、そのような支持体は、「トランスフェクションアレイ」とも呼ばれる。

#### 【0543】

ここで、本発明の支持体で使用される塩としては、塩化カルシウム、リン酸水素ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、ピルビン酸ナトリウム、HEPES、塩化カルシウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫化マグネシウム、硝酸鉄、アミノ酸およびビタミンなどが挙げられるがそれらに限定されない。この塩としては、好ましくは、塩化ナトリウムなどが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0544】

本発明の支持体において使用される遺伝子導入試薬は、カチオン性高分子、カチオン性脂質、ポリアミン系試薬、ポリイミン系試薬、リン酸カルシウム、オリゴフェクタミンおよびオリゴフェクターなどが挙げられるがそれらに限定されない。この遺伝子導入試薬としては、好ましくは、リポフェクトアミン、オリゴフェクタミンおよびオリゴフェクターが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0545】

本発明の支持体において使用されるアクチン作用物質としては、フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチンが挙げられるがそれらに限定されない。このアクチン作用物質としては、好ましくは、フィブロネクチンが挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0546】

本発明の支持体において使用される核酸分子としては、転写制御配列（例えば、プロモーター、エンハンサーなど）、遺伝子コード配列、非翻訳領域を含むゲノム配列、宿主ゲノムにコードされていない核酸配列（蛍光タンパク質遺伝子、大腸菌・酵母自己複製起点、GAL4ドメイン等）を含む核酸分子が挙げられるがそれらに限定されない。この核酸分子としては、好ましくは、転写制御配列（例えば、プロモーター、エンハンサーなど）、遺伝子コード配列、非翻訳領域を含むゲノム配列が挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0547】

本発明の支持体において使用される細胞としては、幹細胞、樹立細胞株、初代培養細胞、昆虫細胞、細菌細胞が挙げられるがそれらに限定されない。この細胞としては、好ましくは、幹細胞、樹立細胞株、初代培養細胞が挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0548】

本発明の支持体において使用される支持体の材料は、ガラス、シリカ、およびプラスチックなどが挙げられるがそれらに限定されない。この材料としては、好ましくは、コーティングされた上記材料が挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0549】

別の局面において、本発明は、固定された複数の細胞を含み、かつ、該細胞の環境を同一に維持し得る支持体を生産する方法を提供する。この方法は、A) 支持体を提供する工程；およびB) 細胞を塩および正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体を用いて該支持体上に固定する工程、を含む。支持体の提供は、市販のものを入手するか、あるいは、支持体材料を成型することによって達成され得る。支持体材料を調製する必要があるときは、そのような材料の原料の混合などによって調製することができる。固定する工程もまた、当該分野におい

て公知の技術を用いて行うことができるそのような固定技術としては、例えば、インクジェットプリント法、ピンアレイ法、スタンプ法が挙げられるがそれらに限定されない。そのような技術は、周知であり、当業者は適宜そのような技術を用いて実施することができる。

#### 【0550】

好ましい実施形態において、本発明における固定工程は、前記塩と、前記正に荷電した物質としての遺伝子導入試薬と、アクチン作用物質と、前記負に荷電した物質としての核酸分子と、前記細胞との混合物を、アレイ状に固定することを含む。このような固定は、プリント技術を用いて達成され得る。

#### 【0551】

別の局面において、本発明は、固定された複数の細胞を含み、かつ、該細胞の環境を同一に維持し得る支持体を生産する装置を提供する。この装置は、A) 支持体を提供する手段；およびB) 細胞を塩および正に荷電した物質と負に荷電した物質との複合体を用いて該支持体上に固定する手段を備える。支持体の提供の実現は、上述の方法を行うことができる手段を用いて達成され得る。そのような手段としては、例えば、支持体の成型手段、材料の調製手段（例えば、混合手段）などが挙げられるがそれらに限定されない。成型手段は、当該分野において周知の技術を使用することができる。固定手段は、プリント手段を含み、そのような手段としては、市販のインクジェットプリンターを利用することが可能である。

#### 【0552】

本明細書において引用された、科学文献、特許、特許出願などの参考文献は、その全体が、各々具体的に記載されたのと同じ程度に本明細書において参考として援用される。

#### 【0553】

以上、本発明を、理解の容易のために好ましい実施形態を示して説明してきた。以下に、実施例に基づいて本発明を説明するが、上述の説明および以下の実施例は、例示の目的のみに提供され、本発明を限定する目的で提供したのではない。従って、本発明の範囲は、本明細書に具体的に記載された実施形態にも実施例



にも限定されず、特許請求の範囲によってのみ限定される。当業者は、以下の実施例から、適宜細胞、支持体、生物学的因子、塩、正に荷電した物質、負に荷電した物質、アクチン作用物質などを選択し、実施することができることが理解される。

#### 【0554】

##### 【実施例】

以下に実施例を示して本発明をさらに詳しく説明するが、この発明は以下の例に限定されるものではない。以下の実施例において用いられる試薬、支持体などは、例外を除き、Sigma (St. Louis, USA、和光純薬 (大阪、日本)、松浪硝子 (岸和田、日本) などから市販されるものを用いた。

#### 【0555】

##### (実施例1：試薬)

この実施例において調製したものは以下のとおりである。

#### 【0556】

アクチン作用物質の候補として、種々の細胞外マトリクスタンパク質およびその改変体もしくはそのフラグメントを準備した。この実施例において調製したものは以下のとおりである。フィブロネクチンなどは、市販のものを用い、フラグメントおよび改変体は、遺伝子操作して改変したものを用いた。

- 1) フィブロネクチン (配列番号11) ;
- 2) フィブロネクチン29kDaフラグメント ;
- 3) フィブロネクチン43kDaフラグメント ;
- 4) フィブロネクチン72kDaフラグメント ;
- 5) フィブロネクチン改変体 (配列番号11のうち、152位のアラニンをロイシンに変化させたもの) ;
- 6) プロネクチンF (三洋化成、京都、日本) ;
- 7) プロネクチンL (三洋化成) ;
- 8) プロネクチンPlus (三洋化成) ;
- 9) ラミニン (配列番号6、8および10) ;
- 10) RGDペプチド (トリペプチド) ;

- 11) RGDを含んだ30kDaペプチド;
- 12) ラミニンの5アミノ酸 (IKVAV) ;
- 13) ゼラチン。

#### 【0557】

DNAとしてトランスフェクションのためのプラスミドを調製した。プラスミドとして、pEGFP-N1およびpDsRed2-N1 (ともにBD Biosciences, Clontech, CA, USA) を用いた。これらのプラスミドでは、遺伝子発現はサイトメガロウイルス (CMV) の制御下にある。プラスミドDNAを、E. coli (XL1 blue, Stratgene, TX, USA) 中で増幅し増幅したプラスミドDNAを複合体パートナーの一方として用いた。DNAは、DNaseもRNaseも含まない蒸留水中に溶解した。

#### 【0558】

使用したトランスフェクション試薬は以下の通りである: Effectene Transfection Reagent (cat. no. 301425, Qiagen, CA), TransFast™ Transfection Reagent (E2431, Promega, WI), Tfx™-20 Reagent (E2391, Promega, WI), SuperFect Transfection Reagent (301305, Qiagen, CA), PolyFect Transfection Reagent (301105, Qiagen, CA), LipofectAMINE 2000 Reagent (11668-019, Invitrogen corporation, CA), JetPEI (×4) conc. (101-30, Polyplus-transfection, France) およびExGen 500 (R0511, Fermentas Inc., MD)。トランスフェクション試薬は、上記DNAおよびアクチン作用物質にあらかじめ加えるかあるいはDNAと複合体を先に生成してから使用した。

#### 【0559】

このようにして調製した溶液を以下のトランスフェクションアレイを用いたア

ッセイに用いた。

#### 【0560】

(実施例2: トランスフェクションアレイ-間葉系幹細胞を用いた実証)

本実施例では、固相におけるトランスフェクション効率の改善を観察した。そのプロトコルを以下に示す。

#### 【0561】

(プロトコル)

DNAの最終濃度は、 $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ に調整した。アクチン作用物質は、 $\text{ddH}_2\text{O}$ 中で $10\mu\text{g}/\mu\text{L}$ のストックとして保存した。全ての希釈をPBS、 $\text{ddH}_2\text{O}$ またはダルベッコMEM培地を用いて行った。希釈系列として、例えば、 $0.2\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $0.27\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $0.4\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $0.53\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $0.6\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $0.8\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $1.0\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $1.07\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $1.33\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、などを調製した。

#### 【0562】

トランスフェクション試薬は、それぞれの製造業者が提供する指示書に従って、使用した。

#### 【0563】

プラスミドDNA: グリセロールストックから100mLのL-amp中で一晚増殖させ、Qiaprep MiniprepまたはQiagen Plasmid Purification Maxiを用いて製造業者が提供する標準プロトコルによって精製した。

#### 【0564】

本実施例では、以下の5種類の細胞を利用して、効果を確認した: ヒト間葉系幹細胞 (hMSCs、PT-2501、Cambrex BioScience Walkersville, Inc., MD)、ヒト胚性腎細胞 (HEK293、RCB1637、RIKEN Cell Bank, JPN)、NIH3T3-3細胞 (RCB0150, RIKEN Cell Bank, JPN)、HeLa細胞 (RCB0007、RIKEN Cell Bank, JPN) およびHepG2 (RCB1648、RIKEN Cell Bank, JPN)

）。これらは、L-glutおよびpen/strepを含むDMEM/10% IFS中で培養した。

#### 【0565】

(希釈およびDNAのスポット)

トランスフェクション試薬とDNAとを混合してDNA-トランスフェクション試薬複合体を形成させる。複合体形成にはある程度の時間が必要であることから、上記混合物を、アレイ作製機 (arrayer) を用いて固相支持体 (例えば、ポリ- $\epsilon$ -リジンスライド) にスポットした。本実施例では、固相支持体として、ポリ- $\epsilon$ -リジンスライドのほか、APSスライド、MASスライド、コーティングなしのスライドを用いた。これらは、松浪硝子 (岸和田、日本) などから入手可能である。

#### 【0566】

複合体形成およびスポット固定のために、真空乾燥機中で一晩スライドを乾燥させた。乾燥時間の範囲は、2時間から1週間とした。

#### 【0567】

アクチン作用物質は、上記複合体形成時に使用してもよいが、本実施例では、スポッティングの直前に使用する形態も試験した。

#### 【0568】

(混合液の調製および固相支持体への適用)

エッペンドルフチューブに、300  $\mu$ LのDNA濃縮緩衝液 (EC緩衝液) + 16  $\mu$ Lのエンハンサーを混合した。これをボルテックスによって混合し、5分間インキュベートした。50  $\mu$ Lのトランスフェクション試薬 (Effectedeneなど) を加え、そしてピペッティングによって混合した。トランスフェクション試薬を適用するために、スライドのスポットのまわりにワックス環状バリアーを引いた。スポットのワックスで囲まれた領域に366  $\mu$ Lの混合物を加え、室温で10から20分間インキュベートした。これにより、支持体への手動による固定が達成された。

#### 【0569】

(細胞の分配)

次に、細胞を添加するプロトコルを示す。トランスフェクトのために細胞を分配した。この分配は、通常、フード内で試薬を減圧吸引して行った。スライドを皿に置き、そしてトランスフェクションのために細胞を含む溶液を加えた。細胞の分配は、以下のとおりである。

#### 【0570】

細胞の濃度が25 mL中 $10^7$ 細胞になるように、増殖中の細胞を分配した。四角の $100 \times 100 \times 15$  mmのペトリ皿または半径 $100$  mm $\times 15$  mmの円形ディッシュ中で、スライド上に細胞をプレーティングした。約40時間、トランスフェクションを進行させた。これは、約2細胞周期にあたる。免疫蛍光のためにスライドを処理した。

#### 【0571】

(遺伝子導入の評価)

遺伝子導入の評価は、例えば、免疫蛍光、蛍光顕微鏡検査、レーザー走査、放射性標識および感受性フィルムまたはエマルジョンを用いた検出によって達成した。

#### 【0572】

可視化されるべき発現されたタンパク質が蛍光タンパク質であるなら、それらを蛍光顕微鏡検査で見てそして写真を撮ることができる。大きな発現アレイに関しては、スライドをデータ保存のためにレーザースキャナーで走査し得る。発現されたタンパク質を蛍光抗体が検出し得るなら、免疫蛍光のプロトコルを引き続いて行うことができる。検出が放射能に基づくなら、スライドを上記で示したように付着し得、そしてフィルムまたはエマルジョンを用いたオートラジオグラフィによって放射能を検出することができる。

#### 【0573】

(レーザー走査および蛍光強度定量)

トランスフェクション効率を定量するために、本発明者らは、DNAマイクロアレイスキャナ (GeneTAC UC4 $\times$ 4、Genomic Solutions Inc., MI) を使用した。総蛍光強度 (任意の単位) を測定した後、表面積あたりの蛍光強度を計算した。

## 【0574】

(共焦点顕微鏡による切片観察)

使用した細胞を、組織培養ディッシュに最終濃度  $1 \times 10^5$  細胞/ウェルで播種し、適切な培地を用いて（ヒト間葉系細胞の場合ヒト間葉系細胞基本培地（MSCGM、BulletKit PT-3001、Cambrex BioScience Walkersville, Inc.、MD, USA）を用いた）培養した。細胞層を4%パラホルムアルデヒド溶液で固定した後、染色試薬であるSYTOおよびTexas Red-Xファロイジン（Molecular Probes Inc.、OR, USA）を細胞層に添加して、核およびFアクチンを観察した。遺伝子産物によって発色するサンプルまたは染色されたサンプルを共焦点レーザー顕微鏡（LSM510、Carl Zeiss Co.、Ltd、ピンホールサイズ =  $Ch1 = 123 \mu m$ 、 $Ch2 = 108 \mu m$ ；画像間隔 = 0.4）を用いて、切片像を得た。

## 【0575】

(結果)

図1に一例としてHEK293細胞を用いた場合の種々のアクチン作用物質およびコントロールとしてのゼラチンを用いた結果を示す。

## 【0576】

結果から明らかなように、ゼラチンを用いた系ではトランスフェクションがあまり成功していないのに対して、フィブロネクチン、フィブロネクチンの改変体であるプロネクチン（プロネクチンF、プロネクチンL、プロネクチンPlus）およびラミニンでは、顕著にトランスフェクションが起こっていた。従って、このような分子は、トランスフェクション効率を顕著に上昇させることが実証された。RGDペプチド単体では、その効果はほとんど見えなかった。

## 【0577】

図2および3に、フィブロネクチンのフラグメントを用いた場合のトランスフェクション効率の結果を示す。図4にその結果をまとめた図を示す。29 kDa および72 kDaのフラグメントは、トランスフェクション活性が顕著に示され、43 kDaフラグメントは、活性はあるものの、その程度は、低かった。従っ

て、29 kDaに含まれるアミノ酸配列がトランスフェクション効率の上昇に役割を果たしていることが示唆される。29 kDaフラグメントは、夾雑がほとんど見られなかったのに対して、他の二つのフラグメント（43 kDaおよび72 kDa）では、夾雑が見られた。従って、29 kDaドメインのみをアクチン作用物質として使用することが好ましくあり得る。また、RGDペプチドのみではトランスフェクション効率上昇活性は示されなかったが、これをつけた30 kDaのペプチドでは活性が見られた。また、ラミニンの6アミノ酸をつけ高分子量にした系でもトランスフェクション活性が見られた。従って、これらのペプチド配列もまた、トランスフェクション効率上昇活性において重要な役割を果たし得るがそれに限定されない。このような場合、少なくとも5 kDa、好ましくは少なくとも10 kDa、より好ましくは少なくとも15 kDaの分子量を含むことがトランスフェクション効率上昇に必要であり得る。

#### 【0578】

次に、種々の細胞におけるトランスフェクション効率を調べた結果を図5に示す。図5では、従来トランスフェクションが可能な細胞としてHEK293細胞、HeLa細胞、3T3細胞、ならびに従来トランスフェクションがほとんど不可能といわれていたHepG2細胞および間葉系幹細胞（MSC）を用いた本発明のトランスフェクション方法の効果を示す。縦軸にはGFPの強度を示した。

#### 【0579】

図5では、本発明の固相支持体を用いたトランスフェクション法との比較対照として、従来の液相トランスフェクション法を示した対比した。従来型の液相トランスフェクションの方法は、キットを製造する製造会社の推奨する方法に従って行った。

#### 【0580】

図5から明らかなように、従来トランスフェクション可能とされていたHEK293、HeLa、3T3はもちろん、トランスフェクション不可能とされていたHepG2およびMSCでも、HeLaおよび3T3に匹敵するトランスフェクション効率達成された。このような効果は、従来のトランスフェクション系では決して達成されなかったことであり、事実上すべての細胞についてトランス

フェクション効率を上昇させることができ、実用に耐え得るトランスフェクションをすべての細胞に提供する系が史上初めて提供されたことになる。また、固相条件を採用したことによって、相互夾雑も顕著に減少した。従って、固相支持体を使用する場合本発明は、集積化バイオアレイを製造するために適切な方法であることが実証された。

#### 【0581】

次に図6として、種々のプレートを用いた場合のトランスフェクションの状態を示す結果を提供する。図6の結果からも明らかなように、コーティングをした場合、コーティングをしていない場合よりも夾雑が少なくなっており、トランスフェクション効率も上昇しているようであることが明らかになった。

#### 【0582】

次に、図7として、フィブロネクチンの濃度を0、0.27、0.53、0.8、1.07および1.33（それぞれ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ）としてトランスフェクションを行った場合の結果を示す。図7では、PLL（ポリ-L-リジン）およびAPSでコーティングされたスライドおよびコーティングされていないスライドについて示す。

#### 【0583】

図7の結果から明らかなように、トランスフェクション効率は、フィブロネクチン濃度の上昇に伴って上昇することが明らかになった。ただし、PLLコーティングおよびコーティングなしの場合には、0.53 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ を超えると効率がプラトーに達していることがわかる。他方、APSの場合は、1.07 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ を超えても効果の上昇が見られた。

#### 【0584】

次に図8として、フィブロネクチンの有無での、細胞接着プロファイルを示す写真を示す。図9には、切片写真を示す。接着細胞の形状は、顕著に異なることが明らかになった（図8）。細胞培養の最初の3時間で、フィブロネクチン有の方は、細胞が完全に伸展したのに対して、フィブロネクチン無のほうは、伸展が限られていた（図9）。アクチンフィラメントの挙動を観察した図9の結果について経時的に観察した結果を勘案すると、固相支持体上に沈着したフィブロネク



チンのようなアクチン作用物質がアクチンフィラメントの形状および方向に影響を与え、トランスフェクション効率などの物質の細胞への導入効率を上昇させるものと考えられる。具体的には、フィブロネクチンの存在下では、アクチンフィラメントは、迅速に配置転換し、細胞伸展とともに核の下にある細胞質空間から消失する。フィブロネクチンのようなアクチン作用物質によって誘導される核周辺のアクチン枯渇によって、DNAなどの標的物質が細胞内および必要に応じて核内へ移行すると考えられる。理論に束縛されないが、これは、細胞質の粘性の低下および正に荷電したDNA粒子が負に荷電したアクチンフィラメントに捕捉されることを防止するという効果に起因すると考えられる。また、核の表面積は、フィブロネクチン存在下で顕著に拡大することから(図10)、DNAなどの標的物質の核への移行が容易になるものと考えられる。

#### 【0585】

(実施例3: バイオアレイへの応用)

次に、上述の効果がアレイを用いた場合でも実証されるかどうかを確認するために規模拡大して実験を行った。

#### 【0586】

(実験プロトコル)

(細胞供給源、培養培地、および培養条件)

この実施例では、5種類の異なる細胞株を使用した: ヒト間葉系幹細胞(hMSC、PT-2501、Cambrex BioScience Walkersville, Inc., MD)、ヒト胚性腎細胞HEK293(RCB1637、RIKEN Cell Bank, JPN)、NIH3T3-3(RCB0150、RIKEN Cell Bank, JPN)、HeLa(RCB0007、RIKEN Cell Bank, JPN)、およびHepG2(RCB1648、RIKEN Cell Bank, JPN)。ヒトMSC細胞の場合、この細胞を、市販のヒト間葉細胞基底培地(MSCGM BulletKit PT-3001, Cambrex BioScience Walkersville, Inc., MD)中で維持した。HEK293細胞、NIH3T3-3細胞、HeLa細胞およびHepG2細胞の場合、これらの細胞を、10% ウ

シ胎仔血清 (FBS、29-167-54、Lot No. 2025F、Dainippon Pharmaceutical CO., LTD., JPN) を有するダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM、L-グルタミンおよびピルビン酸ナトリウムを有する高グルコース (4.5 g/L) ; 14246-25、Nakalai Tesque, JPN) 中で維持した。全ての細胞株を、37℃、5% CO<sub>2</sub>に制御されたインキュベーター中で培養した。hMSCを含む実験において、本発明者らは、表現型の変化を回避するために、5継代未満のhMSCを使用した。

### 【0587】

(プラスミドおよびトランスフェクション試薬)

トランスフェクションの効率を評価するために、pEGFP-N1ベクターおよびpDsRed2-N1ベクター (カタログ番号6085-1、6973-1、BD Biosciences Clontech, CA) を使用した。共に遺伝子発現は、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーターの制御下であった。トランスフェクトされた細胞は、それぞれ、連続的にEGFPまたはDsRed2を発現した。プラスミドDNAを、Escherichia coli、XL1-blue株 (200249, Stratagene, TX) を使用して増幅し、そしてEndoFree Plasmid Kit (EndoFree Plasmid Maxi Kit 12362, QIAGEN, CA) によって精製した。全ての場合において、プラスミドDNAを、DNaseおよびRNaseを含まない水に溶解した。トランスフェクション試薬は以下のようにして得た: Effectene Transfection Reagent (カタログ番号301425, Qiagen, CA)、TransFast™ Transfection Reagent (E2431, Promega, WI)、Tfx™-20 Reagent (E2391, Promega, WI)、SuperFect Transfection Reagent (301305, Qiagen, CA)、PolyFect Transfection Reagent (301105, Qiagen, CA)、LipofectAMINE 2000 Reagent (11668-019, Invitrogen

corporation、CA)、JetPEI (×4) conc. (101-30、Polypplus-transfection、France)、およびExGen 500 (R0511、Fermentas Inc., MD)。

#### 【0588】

(固相系トランスフェクションアレイ (SPTA) 生成)

「リバーストランスフェクション」についてのプロトコルの詳細は、ウェブサイト [http://staffa.wi.mit.edu/sabatini\\_public/reverse\\_transfection.htm](http://staffa.wi.mit.edu/sabatini_public/reverse_transfection.htm) の「Reverse Transfection Homepage」に記載されていた。本発明者らの固相系トランスフェクション (SPTA方法) において、疎水性フッ素樹脂コーティングによって分離した48平方パターン (3mm×3mm) を有する3つの型のスライドガラス (シラン処理したスライドガラス; APSスライド、およびポリ-L-リジンでコーティングしたスライドガラス; PLLスライド、およびMASでコーティングしたスライド; Matsunami Glass Ind., LTD., JPN) を研究した。

#### 【0589】

(プラスミドDNAプリンティング溶液の調製)

SPTAを生成するための2つの異なる方法を開発した。その主な違いは、プラスミドDNAプリンティング溶液の調製にある。

#### 【0590】

(方法A)

Effectene Transfection Reagentを使用する場合、プリンティング溶液は、プラスミドDNAおよび細胞接着分子 (4mg/mLの濃度で超純水に溶解したウシ血漿フィブロネクチン (カタログ番号16042-41、Nakalai Tesque、JPN)) を含んだ。上記の溶液を、インクジェットプリンタ (synQUADTM、Cartesian Technologies, Inc., CA) を用いてか、または手動で0.5~10μLチップを用いて、スライドの表面に適用した。このプリントしたスライドガラスを安全キャビネットの内側で室温にて15分間かけて乾燥させた。トラン

スフェクションの前に、総E f f e c t e n e試薬を、DNAプリントしたスライドガラス上に静かに注ぎ、そして室温にて15分間インキュベートした。過剰のE f f e c t e n e溶液を、吸引アスピレーターを用いてスライドガラスから除去し、そして安全キャビネットの内側で室温にて15分間かけて乾燥させた。得られたDNAプリントしたスライドガラスを、100mm培養ディッシュの底に置き、そして約25mLの細胞懸濁液( $2\sim4\times10^4$ 細胞/mL)を、このディッシュに静かに注いだ。次いで、このディッシュを37℃、5% CO<sub>2</sub>のインキュベーターに移し、2～3日間インキュベートした。

### 【0591】

#### (方法B)

他のトランスフェクション試薬 (T r a n s F a s t T M、T f x T M-20、S u p e r F e c t、P o l y F e c t、L i p o f e c t A M I N E 2000、J e t P E I (×4) c o n c. またはE x G e n) の場合、プラスミドDNA、フィブロネクチン、およびトランスフェクション試薬を、製造業業者が配布する指示書に示される比率に従って1.5mLのマイクロチューブ中で均一に混合し、そしてチップ上にプリンティングする前に室温にて15分間インキュベートした。プリンティング溶液を、インクジェットプリンターまたは0.5～10μLチップを用いてスライドガラスの表面上に適用した。このプリントしたスライドガラスを、安全キャビネットの内側で室温にて10分間かけて完全に乾燥させた。プリントしたスライドガラスを100mm培養ディッシュの底に置き、そして約3mLの細胞懸濁液( $2\sim4\times10^4$ 細胞/mL)を添加し、安全キャビネットの内側で室温にて15分間にわたってインキュベートした。インキュベーション後、新鮮な培地をこのディッシュに静かに注いだ。次いで、このディッシュを37℃、5% CO<sub>2</sub>のインキュベーターに移し、2～3日間インキュベートした。インキュベーション後、本発明者らは、蛍光顕微鏡 (I X-71、O l y m p u s P R O M A R K E T I N G, I N C., J P N) を用いて、増強された蛍光タンパク質 (E F P、E G F P、およびD s R e d 2) の発現に基づいてトランスフェクト体を観察した。位相差画像を同じ顕微鏡を用いて撮った。両プロトコルにおいて、細胞をパラホルムアルデヒド (P F A) 固定方法 (P

BS中の4% PFA、処理時間は、室温にて10分間)を用いることによって固定した。

#### 【0592】

(レーザー走査および蛍光強度定量)

トランスフェクション効率を定量するために、本発明者らは、DNAマイクロアレイスキャナ (GeneTAC UC4×4、Genomic Solutions Inc., MI) を使用した。総蛍光強度 (任意の単位) を測定した後、表面積あたりの蛍光強度を計算した。

#### 【0593】

(結果)

(フィブロネクチン支持局所的トランスフェクション)

トランスフェクションアレイチップを、図11に示されるように構築した。トランスフェクションアレイチップは、PLLコーティングされたスライドガラス上でDNA/トランスフェクション試薬およびフィブロネクチンを含む細胞培養液をマイクロプリントすることによって構築した。

#### 【0594】

種々の細胞をこの実施例において用いた。これらの細胞は、通常使用される培養条件で培養した。これらの細胞はスライドガラスに付着することから、細胞は、効率よく取り込まれ、そしてアレイ上に与えられた位置でプリントされたDNAに対応する遺伝子を発現した。通常のトランスフェクション方法 (例えば、カチオン性脂質またはカチオン性高分子媒介トランスフェクション) と比較すると、本発明の方法を用いた場合のトランスフェクション効率は、いずれも顕著に高かった。特に、トランスフェクトすることが困難とされていたHepG2、hMSCなどのような組織幹細胞でも、効率よくトランスフェクトされることが見出されたことは、特に重要である。hMSCの場合には、従来方法の約40倍以上の効率上昇が見られた。また、高密度アレイに必要な高い集積度も達成された (すなわち、アレイ上で隣接するスポット同士の間の夾雑が顕著に減っていた)。これは、EGFPおよびDs-REDのチェック状パターンのアレイを生成することによって確認した。ヒトMSCをこのアレイにおいて培養し、実質的にすべ

ての空間解像度が示されるように対応する蛍光タンパク質を発現させた。その結果図 12 に示されるように、ほとんど夾雑していないことが明らかになった。プリント混合物の個々の成分の役割に関するこの研究に基づいて、種々の細胞に関して、トランスフェクション効率の最適化を行うことができる。

#### 【0595】

(フィブロネクチンによる局所的トランスフェクションにおける効率化)

本発明者らの上述してきたデータを総合すると、フィブロネクチンなどの接着因子または細胞外マトリクスタンパク質と称されていたタンパク質は、細胞接着活性以外の活性を有することが明らかになった。そのような活性としては、種々の細胞によって異なるが、これらの活性は、トランスフェクション効率の上昇に参与していることがわかる。なぜなら、フィブロネクチンの有無で接着の様子を調べた結果(図 8)によると、接着の状態自体は差異が見られなかったからである。

#### 【0596】

(ヒト間葉系幹細胞の固相系トランスフェクションアレイ)

多様な種類の細胞に分化するヒト間葉系幹細胞(hMSC)の能力は、組織再生および組織復活を標的化する研究にとって特に興味深いものになっている。特に、これらの細胞の形質転換についての遺伝子解析は、hMSCの多能性を制御する因子を解明する上で、関心が高まっている。hMSCの研究は、所望の遺伝物質を用いたトランスフェクションが不可能な点にある。

#### 【0597】

これを達成するために、従来の方法は、ウイルスベクターまたはエレクトロポレーションのいずれかの技術を含む。本発明者らが開発した複合体-塩という系を用いることにより、種々の細胞株(hMSCを含む)に対して高いトランスフェクション効率ならびに密集したアレイ中での空間的な局在の獲得を可能にする固相系トランスフェクションが達成された。固相系トランスフェクションの概略を、図 13A に示す。

#### 【0598】

固相系トランスフェクションにより、インビボ遺伝子送達のために使用され得

る「トランスフェクションパッチ」の技術的な達成ならびにhMSCにおける高スループットの遺伝子機能研究のための固相系トランスフェクションアレイ (SPTA) が可能になることが判明した。

#### 【0599】

哺乳動物細胞をトランスフェクトするための多数の標準的な方法が存在するが、遺伝物質のhMSCへの導入については、HEK293、HeLaなどの細胞株を比較して不便かつ困難であることが知られている。従来使用されるウイルスベクター送達またはエレクトロポレーションのいずれも重要であるが、潜在的な毒性 (ウイルス方法)、ゲノムスケールでの高スループット分析を受けにくいこと、およびインビボ研究に対して制限された適用性 (エレクトロポレーションに関して) のような不便さが存在する。

#### 【0600】

固相支持体に簡便に固定することができ、かつ徐放性および細胞親和性を保持した固相支持体固定系が開発されたことにより、これらの欠点のほとんど克服することができた。

#### 【0601】

上述の実験の結果の一例を、図13Bに示す。マイクロプリンティング技術を使用する本発明者らの技術を用いて、選択された遺伝物質、トランスフェクション試薬および適切な細胞接着分子、ならびに塩を含む混合物を、固体支持体上に固定化し得た。混合物を固定化した支持体の上での細胞培養は、その培養細胞に対する、混合物中の遺伝子の取り込みを可能にした。その結果、支持体-接着細胞における、空間的に分離したDNAの取り込みを可能にした (図13B)。

#### 【0602】

本実施例の結果、いくつかの重要な効果が達成された：高いトランスフェクション効率 (その結果、統計学的に有意な細胞集団が研究され得る)、異なるDNA分子を支持する領域間の低い相互夾雑 (その結果、個々の遺伝子の効果が、別々に研究され得る)、トランスフェクト細胞の長期生存、高スループットの互換性のある形式および簡便な検出方法。これらの基準を全て満たすSPTAは、さらなる研究のための適切な基盤となる。

## 【0603】

これらの目的の達成を明確に確立するために、上述のように本発明者らは、5種類の異なる細胞株（HEK293、HeLa、NIH3T3、HepG2およびhMSC）を、本発明者らの方法論（固相系でのトランスフェクション）（図13Aおよび図13Cを参照のこと）および従来の液相系トランスフェクションの両方を用いて一連のトランスフェクション条件下で研究した。SPTAの場合、相互夾雑を評価するために、本発明者らは、チェック模様のパターンでガラス支持体上にプリントした赤色蛍光タンパク質（RFP）および緑色蛍光タンパク質（GFP）を使用し、一方、従来の液相系トランスフェクションを含む実験の場合（ここで、本来、トランスフェクト細胞の自発的な空間的分離は達成され得ない）、本発明者らは、GFPを使用した。いくつかのトランスフェクション試薬を評価した：4つの液体トランスフェクション試薬（Effectene、TransFast<sup>TM</sup>、Tfx<sup>TM</sup>-20、LopofectAMINE 2000）、2つのポリアミン（SuperFect、PolyFect）、ならびに2つの型のポリイミン（JetPEI（×4）およびExGen 500）。

## 【0604】

トランスフェクション効率：トランスフェクション効率を、単位面積あたりの総蛍光強度として決定した（図14A。図14Bはそのイメージを示す。）。使用した細胞株に従って、最適な液相の結果を、異なるトランスフェクション試薬を用いて得た（図14C-Dを参照のこと）。次いで、これらの効率的なトランスフェクション試薬を、固相系プロトコルの最適化に使用した。いくつかの傾向が観察された：容易にトランスフェクト可能な細胞株（例えば、HEK293、HeLa、NIH3T3）の場合、固相系プロトコルで観察されたトランスフェクション効率は、標準的な液相系プロトコルと比較してわずかに優れていたが、本質的に類似したレベルで達成されている（図14）。

## 【0605】

しかし、細胞をトランスフェクトするのが困難な場合（例えば、hMSCおよびHepG2）においてSPTA方法論に最適化した条件を用いることによって、本発明者らは、細胞の特徴を維持しながら、トランスフェクション効率が40



倍まで増加したことを観察した（上述のプロトコルおよび図14C-Dを参照のこと）。hMSCの特定の場合（図15）、最良条件は、ポリエチレンイミン（PEI）トランスフェクション試薬の使用を含んだ。予想したように、高いトランスフェクション効率を実現するための重要な因子は、ポリマー内の窒素原子（N）の数とプラスミドDNA内のリン酸残基（P）の数との間の電荷バランス（N/P比率）、ならびにDNA濃度である。一般的に、N/P比率および濃度における増大は、トランスフェクション効率の増大を生じる。並行して、本発明者らは、hMSCの溶液トランスフェクション実験における高いDNAおよび高いN/P比率の場合に、細胞生存率の有意な低下を観察した。これら2つの拮抗因子に起因して、hMSCの液相系トランスフェクションの効率は、かなり悪い非常に低い細胞生存率（N/P比率>10で観察された）であった。しかし、SPTAプロトコルは、細胞生存率にも細胞形態にも有意に影響を与えることなく、非常に高い（固体支持体に固定された）N/P比率およびDNA濃度を許容し（おそらく、細胞膜に対する固体支持体の安定化効果に起因する）、従って、このことがおそらく、トランスフェクション効率の劇的な改善の原因となっている。SPTAの場合、10のN/P比率が最適であることが見出され、細胞毒性を最小化しながら十分なトランスフェクションレベルを提供する。SPTAプロトコルにおいて観察されたトランスフェクション効率の増大に関するさらなる理由は、高い局所的なDNA濃度/トランスフェクション試薬濃度（これは、液相系トランスフェクション実験において使用される場合は細胞死を生成する）の達成である。

#### 【0606】

チップ上での高いトランスフェクション効率の達成のための重要な点は、使用されるコーティング剤である。ガラス製のチップを用いた場合、PLLが、トランスフェクション効率および相互夾雑の両方に関して、最良の結果を提供することを発見した（下記に考察する）。フィブロネクチンコーティングしない場合、少数のトランスフェクト体を観察した（他のすべての実験条件は一定に保った）。完全に確立したわけではないが、フィブロネクチンの役割はおそらく、細胞接着プロセスを加速し（データは示していない）、ゆえに、表面を離れたDNA拡

散が可能になる時間を制限するということである。

#### 【0607】

低い相互夾雑：SPTAプロトコルで観察されたより高いトランスフェクション効率とは別として、本技術の重要な利点は、別個に分離された細胞アレイの実現であり、その各位置では、選択した遺伝子が発現する。本発明者らは、フィブロネクチンでコーティングしたガラス表面上に、JetPEI（「実験プロトコル」を参照のこと）およびフィブロネクチンと混合した2つの異なるレポーター遺伝子（RFPおよびGFP）をプリントした。得られたトランスフェクションチップを適切な細胞培養に提供した。最良であると見出された実験条件下において、発現されたGFPおよびRFPは、それぞれのcDNAがスポットされた領域に局在した。相互夾雑はほとんど観察されなかった（図16）。しかし、フィブロネクチンまたはPLLの非存在下において、固相でのトランスフェクションの障害となる相互夾雑が観察され、そしてトランスフェクション効率は、有意に低かった（図6を参照）。このことは、細胞接着および支持体表面から離れて拡散するプラスミドDNAの相対的な割合が、高いトランスフェクション効率および高い相互夾雑の両方に対して重要な因子であるという仮説を立証する。

#### 【0608】

相互夾雑のさらなる原因は、固体支持体上のトランスフェクション細胞の移動性であり得る。本発明者らは、数個の支持体上での細胞接着速度（図16C）およびプラスミドDNAの拡散速度の両方を測定した。その結果、最適条件下においてDNA拡散はほとんど生じなかった。しかし、高い相互夾雑条件下において、細胞接着が完了するまでの時間に、相当な量のプラスミドDNAが拡散し、その結果、固相表面からプラスミドDNAが涸渇した。

#### 【0609】

この確立された技術は、経済的な高スループットの遺伝子機能スクリーニングの状況において特に重要である。実際に、必要とされる少量のトランスフェクション試薬およびDNA、ならびに全プロセス（プラスミドの単離から検出まで）を自動化する可能性は、上記の方法の有用性を増大する。

#### 【0610】

結論として、本発明者らは、複合体一塩を用いた系で、hMSCトランスフェクションアレイを好首尾に実現した。このことは、多能性幹細胞の分化を制御する遺伝子機構の解明など、固相系トランスフェクションを利用した種々の研究における高スループット研究を可能にすることになる。固相系トランスフェクションの詳細な機構ならびに高スループットのリアルタイム遺伝子発現モニタリングに対するこの技術の使用に関する方法論は種々の目的に応用可能であることが明らかになった。

#### 【0611】

(実施例4：数理解析)

次に、実施例2の手法を用いて得られたデータをもとにプロファイルを生成した。

#### 【0612】

(分化誘導)

各レポーターを固相支持体に固定し、未分化の間葉系幹細胞の維持培地 (MSCGM、PT-3001、PT-3238、PT-4105、Cambrex、BioWhittaker, USA) において2日間培養後、分化誘導培地 (hMSC Differentiation、PT-3002、PT-4120、Cambrex、BioWhittaker, USA) に培地を換え、各レポーターの応答プロファイルを測定した。

#### 【0613】

(数理解析法)

使用した数理解析法を図18 (図18A-B (18-1~18-2)) に示す。

#### 【0614】

(使用した転写因子)

図19および図24に示すように、17種類の転写因子 (ISRE、RARE、STAT3、GAS、NFAT、MIC、AP1、SRE、GRE、CRE、NFκB、ERE、TRE、E2F、Rb、p53) を、GFPに作動可能に連結したプラスミド (Clontechから市販される) を用いて、間葉系幹細胞

の骨芽細胞分化を観察した。このとき得られたプロファイルを図 19 に示す。また、転写因子レポーターの構築は、図 23 に示されるように行った。

#### 【0615】

転写因子のレポーターのアッセイを行った。これは Clontech により公開されているコントロール条件（細胞、添加因子、培養条件など）にしたがって行った。

#### 【0616】

その結果を図 25 に示す。このように DNA のみと比較した場合、ほとんどの転写因子において誘導因子を添加したときに誘導がかかることが実証された。

#### 【0617】

次に、骨分化誘導の際の転写因子活性の時系列的測定を行った。これは上述の条件に従って、分化誘導させたときにプロファイルを比較したものである。プロファイルは、各レポーター遺伝子を固相系トランスフェクション法を用いて導入し、2 日間未分化維持培地にて培養を行い、骨芽細胞分化誘導培地と交換した。この時点をお骨芽細胞分化開始時間とした。添加因子などに関しては、骨芽細胞分化誘導培地に推奨の濃度にて行った。その他の培養に関しては、Cambrex 社の指示書通りに行った。

#### 【0618】

結果を図 26 に示す。培地交換後 10 時間～30 時間では、図 26 に左のようなプロファイルパターンを示していたのに対し、培地交換後 5～6 日では、右のようなプロファイルパターンを示し、顕著に変動していることが明らかになった。これを、図 27 に示される式を用いて、位相を算出し、その結果を図 27 の右の表にまとめた。このように、分化に特に深い関係がある、ISRE、RARE、STAT3、GRE、CRE、TRE、E2F、および p53 において、位相の反転が見られた。従って、位相を判定することは、プロセスの変化が起こる、つまり、転写制御が起こっていると判定することができることが明らかになった。

#### 【0619】

（プロモーターの任意性）

次に、分化誘導初期において任意に抽出される組み合わせを変化させるときの同定可能性を実証した。解析は図 20 に示されるように行った。

#### 【0620】

この結果を図 20 に示す。この解析により、分化のごく初期に関しては、分化誘導を把握できない（他のノイズもあると考えられる）が、約 15 時間後以降では、確認することが可能であることが判明した。変化を同定することができるのが 100% となったのは、本実施例では 8 以上であったが、抽出数が 3 のときでもすでに 90% を超える同定率を示しており、2 のときでも 88%、1 のときでも 82% を示していることから、1 つでも、2 つでも、あるいは少なくとも 3 つでも、細胞の状態を判定または同定するのに充分であることが明らかになった。

#### 【0621】

（未分化維持）

次に、未分化維持に関して、任意に抽出される組み合わせを変化させて解析した。解析は図 20 に記載されるものに準じて行った。

#### 【0622】

この結果を図 21 に示す。分化誘導時の結果と比べると大きく異なり、この比較によって、本実施例での処理により、幹細胞が分化誘導に向かっているのか未分化を未分化を維持しているのかが判断することができる。このような判断は、少なくとも 1 つの生物学的因子を用いることによって行うことができた。このように少ない数でも十分に細胞の状態を判定することができることは、従来技術では達成できなかったことであり、本発明は、優れた効果を達成したということができる。

#### 【0623】

このようにプロセスを解析することによって、図 22 に示すように、細胞機能の形成は、種々の因子のカクテルパーティープロセスとして記述することが可能であることがわかる。このようなプロセス記述により、本発明は、薬剤応答プロセスおよび分化誘導プロセスの解析を行うことを可能にした。

（実施例 5：抗がん剤）

本実施例では、シスプラチンを抗がん剤の例として、培地に混ぜ、細胞に曝露した。用いた濃度としては、 $1\ \mu\text{M}$ 、 $5\ \mu\text{M}$ 、 $10\ \mu\text{M}$ などを適宜採用して細胞の反応を見た。シスプラチンに耐性の細胞および感受性の細胞に対してシスプラチンを適用し、上述の実施例と同様にしてプロファイルを観察した。その結果、シスプラチンの濃度および耐性/感受性の違いにより、顕著にプロファイルが変動することが明らかになった。

#### 【0624】

(実施例6: RNAi)

実施例1に記載されるように細胞を固定し、生物学的因子としてRNAiを用いて遺伝子ノックダウン効果に関するプロファイルを取得することができることを実証した。RNAiとして以下のものを用いて、以下の実験を行った。リボザイム、siRNAなどの遺伝子発現抑制法を用いて遺伝子発現抑制を行った細胞における応答反応をプロフィールとして得ることが可能である。

#### 【0625】

RNAi: <http://www.nippongene.jp/pages/products/sirna/review/>において入手可能な配列(例えば、Control siRNA duplex)を使用した。

#### 【0626】

(RNAiのトランスフェクション)

siRNAがまず、ノックダウンし得るかどうかを確認した。EGFPに対する5'-AAGCAGCAGGACUUCUCAAG-3' siRNA(配列番号12)を合成し、これを上述の実施例に記載されるようにアレイ基板を調製した。ここでは、プロモーター配列を含む核酸分子の代わりにsiRNAを用いてアレイ基板を調製した。このアレイ基板を用いてトランスフェクトすると、標的遺伝子の発現が効果的に抑制されるかどうかを確認した。そのプロトコルは、図28に示される。

#### 【0627】

(結果)

siRNAによる標的遺伝子抑制の効果を示す結果を図29に示す。実際に標的遺伝子の発現が効果的に抑制された。このゲルでの結果は、任意のデータ形式でプロファイルとして格納することができる。

## 【0628】

次に、siRNAでの結果をプロファイルデータとして保存する。(5 $\mu$ m/pixel以下の解像度有するTIFFフォーマットの画像データ)。このようにsiRNAでの結果は、プロファイルデータとして保存できる。そのような形式は、この実施例で示した形式に限定されず、当業者は任意の形式を用いることができる。

## 【0629】

(実施例7: テトラサイクリン依存性プロモーターを用いた遺伝子発現調節)

実施例1~3に記載の実施例と同様に、テトラサイクリン依存性プロモーターを用いて遺伝子発現調節がどのようになされるかをプロファイルとして生成することができることを実証した。使用した配列は以下のとおりである。

## 【0630】

テトラサイクリン依存性プロモーター (およびその遺伝子ベクター構築物) としては、BD BiosciencesのpTet offおよびpTet onベクター系を用いた (<http://www.clontech.com/techinfo/vectors/cattet.shtml>を参照)。ベクターは、pTRE-d2EGFPを利用した (<http://www.clontech.com/techinfo/vectors/vectorsT-Z/pTRE-d2EGFP.shtml>に記載されている)。

## 【0631】

(プロトコル)

アレイ基板上に、テトラサイクリン依存性プロモーターと、非依存性プロモーター (配列をご教示ください) とをプリントし、同一基板上においてテトラサイクリンによる遺伝子発現調節がされるかどうかをリアルタイムで計測した。その結果を、図30に示す。図30に示されるように、依存性プロモーターでのみ遺伝子発現の変化が測定された。図31には、非依存性と依存性における発現の実際の様子を写真として示す。このように、肉眼でもはっきりわかる程度に比較可能に変化が測定可能となる。

## 【0632】

(プロファイルデータの測定)

リアルタイムに取得した画像をもとにして、細胞あたり、面積あたりの輝度変化をグラフ化し、ノイズ除去などの一次変換の後、多変量解析、信号処理法など

を適用し、プロファイルデータを提示することができた。これを現象ごと、細胞ごとに比較することで、細胞特有の応答や同一性を取得することができた。

### 【0633】

(実施例 7：遺伝子発現)

次に、構造遺伝子をコードする核酸分子を用いて細胞のプロファイルを作成した。ここでは、構造遺伝子として、嗅覚レセプター I 7（配列番号 13、14）を使用した。プロトコルは、実施例 1～3 に準じた。

### 【0634】

その結果、プロモーターと同様に、遺伝子産物の量などを測定することで、細胞のプロファイルを作成することができることが実証された。

### 【0635】

(実施例 8：アポトーシスシグナル)

次に、細胞内にあるカスパーゼ 3 の活性化に着目してモニターしても、細胞のプロファイルを作成することができることを調べた。トランスフェクトおよびアレイの調製は上述の実施例と同様に行った。

### 【0636】

ここでは、pCaspase3-Sensor Vector (BD Biosciences Clontech, 1020 East Meadow Circle, Palo Alto, CA 94303; カタログ番号 8185-1) を用いて、アポトーシスシグナルであるカスパーゼ 3 をモニターした。

### 【0637】

その結果、プロモーターと同様に、アポトーシスシグナルなどを測定することで、細胞のプロファイルを作成することができることが実証された。

### 【0638】

(実施例 9：ストレスシグナル)

次に、細胞内にある JNK、ERK、p38 などのアポトーシスシグナルを転写因子レポーターを使用してストレスシグナルに関し細胞のプロファイルを作成することができることを調べた。トランスフェクトおよびアレイの調製は上述の実施例と同様に行った。



## 【0639】

ここでは、BD Bioscience Clontechから入手したpAP1-EGFP、pCRE-EGFP、pSRE-EGFPを用いて、ストレスシグナルであるJNK、ERK、p38をモニターした。

## 【0640】

その結果上述の実施例と同様に、ストレスシグナルなどを測定することで、細胞のプロファイルを作成することができることが実証された。

## 【0641】

(実施例10：分子局在化)

次に、蛍光タンパク質を目的遺伝子に融合させ、その発現プロファイルおよび細胞内における局在化を可視化することができることを実証した。

## 【0642】

ここでは、蛍光タンパク質として、GFP, RFP, CFP, BFPを使用し、目的遺伝子として、KIAAクローン、cDNAライブラリーなどを使用し、これらを用いて遺伝子構築物を作製した。具体的に使用したものは以下のとおりである。

## 【0643】

KIAA cDNAクローン (KIAA=かずさDNA研究所、かずさ、千葉から入手可能)

インビトロジェンのcDNA市販ライブラリー

トランスフェクトおよびアレイの調製は上述の実施例と同様に行った。

## 【0644】

ここでは、KIAAクローンの内のKIAA1474を用いて、発現プロファイルおよび局在化をモニターした。

## 【0645】

その結果上述の実施例と同様に、意図的に構築した遺伝子構築物を用いて、意図したパラメータについて、細胞のプロファイルを作成することができることが実証された。

## 【0646】

(実施例11：細胞形態変化)

次に、ある遺伝子を発現させて、あるいは、ノックダウンし、あるいは、添加物質（ここでは、化学物質としてグリセロフォスフェートを使用し、サイトカインとしてデキサメタゾンを使用する）細胞形態の変化をプロファイルとして取得することができることを実証した。細胞形態としては、細胞の多核化、伸展状態、伸展突起の伸長などを、三次元データとして取得し、解析した。

#### 【0647】

ここでは、導入した核酸分子の具体的な配列は以下のとおりである。

#### 【0648】

KIAAクローン（前出）

転写因子に対するRNAi（CBFA-1, AP1）。

#### 【0649】

トランスフェクトおよびアレイの調製は上述の実施例と同様に行った。

#### 【0650】

ここでは、上述の実施例で用いた間葉系幹細胞を用いて、骨芽細胞分化誘導した際の細胞形態をモニターした。

#### 【0651】

その結果上述の実施例と同様に、意図的に構築した遺伝子構築物を用いて、意図したパラメータについて、細胞のプロファイルを作成することができることが実証された。

#### 【0652】

（実施例12：分子間相互作用）

次に、ツーハイブリッドシステム、FRET、BRETなどの手法を用いて細胞のプロファイルを取得することができることを実証した。

#### 【0653】

ここでは、導入した核酸分子の具体的な配列は以下のとおりである。

#### 【0654】

嗅覚レセプター（配列番号13～38に示す配列をもつもの）とGタンパク質（配列番号39～44に示す配列をもつもの）

トランスフェクトおよびアレイの調製は上述の実施例と同様に行った。

**【0655】**

ここでは、嗅覚レセプターとGタンパク質の解離を臭い物質の誘導によってモニターし、これを蛍光波長の変化として用いて、細胞をモニターした。

**【0656】**

ここで使用したツーマイブリッドシステム、FRETおよびBRETは、具体的には以下のようにして行った。

**【0657】**

ツーマイブリッドシステム (Clontechから入手; <http://www.clontech.co.jp/product/catalog/007003006.shtml>)。FRETおよびBRETは、ベルツールドジャパンから入手可能な機器を用いて測定した。

**【0658】**

その結果上述の実施例と同様に、意図的に構築した遺伝子構築物を用いて、ツーマイブリッドシステム、FRET、BRETなどによっても、細胞のプロファイルを作成することができることが実証された。

**【0659】**

(実施例13：レセプターーリガンド)

次に、レセプターとリガンドとの相互作用を指標に細胞のプロファイルを取得することができることを実証した。細胞膜、核膜などに存在するレセプタータンパク質とリガンドとの相互作用情報を取得することは、細胞内のネットワーク形成に有用である。

**【0660】**

この実施例において調製したものは以下のとおりである。

**【0661】**

(細胞接着因子)

細胞接着分子の候補として、種々の細胞外マトリクスタンパク質およびその改変体もしくはそのフラグメントを準備した。この実施例において調製したものは以下のとおりである。細胞接着因子などは、市販のものを用いた。

- 1) プロネクチンF (三洋化成、京都、日本) ;
- 2) プロネクチンL (三洋化成) ;

- 3) プロネクチン P l u s (三洋化成) ;
- 4) フィブロネクチン (配列番号 2)
- 5) ゼラチン。

#### 【0662】

DNAとしてトランスフェクションのためのプラスミドを調製した。プラスミドとして、pEGFP-N1およびpDsRed2-N1(ともにBD Biosciences, Clontech, CA, USA)を用いた。EGFの配列は、配列番号45-46に示される。これらのプラスミドでは、遺伝子発現はサイトメガロウイルス(CMV)の制御下にある。プラスミドDNAを、E.coli(XL1 blue, Stratgene, TX, USA)中で増幅し増幅したプラスミドDNAを複合体パートナーの一方として用いた。DNAは、DNaseもRNaseも含まない蒸留水中に溶解した。

#### 【0663】

使用したトランスフェクション試薬は以下の通りである：Effectene Transfection Reagent(cat.no.301425, Qiagen, CA), TransFast™ Transfection Reagent(E2431, Promega, WI), Tfx™-20 Reagent(E2391, Promega, WI), SuperFect Transfection Reagent(301305, Qiagen, CA), PolyFect Transfection Reagent(301105, Qiagen, CA), LipofectAMINE 2000 Reagent(11668-019, Invitrogen corporation, CA), JetPEI(×4)conc.(101-30, Polyplus-transfection, France)およびExGen 500(R0511, Fermentas Inc., MD)。トランスフェクション試薬は、上記DNAおよび細胞接着分子にあらかじめ加えるかあるいはDNAと複合体を先に生成してから使用した。

#### 【0664】

このようにして調製した溶液を以下のトランスフェクションアレイ作製に用いた。次に固相におけるトランスフェクション効果を観察した。そのプロトコルを以下に示す。

#### 【0665】

(プロトコル)

DNAの最終濃度は、 $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ に調整した。細胞接着分子は、 $\text{ddH}_2\text{O}$ 中で $10\mu\text{g}/\mu\text{L}$ のストックとして保存した。全ての希釈をPBS、 $\text{ddH}_2\text{O}$ またはDMEM培地を用いて

行った。希釈系列として、例えば、 $0.2\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $0.27\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $0.4\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $0.53\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $0.6\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $0.8\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $1.0\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $1.07\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $1.33\mu\text{g}/\mu\text{L}$ などを調製した。

#### 【0666】

トランスフェクション試薬は、それぞれの製造業者が提供する指示書に従って、使用した。

#### 【0667】

プラスミドDNA：グリセロールストックから100mLのLamp中で一晩増殖させ、Qiaprep MiniprepまたはQiagen Plasmid Purification Maxiを用いて製造業者が提供する標準プロトコールによって精製した。

#### 【0668】

本実施例では、以下の5種類の細胞を利用して、効果を確認した：ヒト間葉系幹細胞 (hMSCs、PT-2501、Cambrex BioScience Walkersville, Inc., MD)、ヒト胚性腎細胞 (HEK293、RCB1637、RIKEN Cell Bank, JPN)、NIH3T3-3細胞 (RCB0150, RIKEN Cell Bank, JPN)、HeLa細胞 (RCB0007、RIKEN Cell Bank, JPN) および HepG2 (RCB1648、RIKEN Cell Bank, JPN)。これらは、L-glutおよびpen/strepを含むDMEM/10%IFS中で培養した。

#### 【0669】

(希釈およびDNAのスポット)

トランスフェクション試薬とDNAとを混合してDNA-トランスフェクション試薬複合体を形成させる。複合体形成にはある程度の時間が必要であることから、上記混合物を、アレイ作製機 (arrayer) を用いて固相支持体 (例えば、ポリ- $\alpha$ -リジンスライド) にスポットした。本実施例では、固相支持体として、ポリ- $\alpha$ -リジンスライドのほか、APSスライド、MASスライド、コーティングなしのスライドを用いた。これらは、松浪硝子 (岸和田、日本) などから入手可能である。

#### 【0670】

複合体形成およびスポット固定のために、真空乾燥機中で一晩スライドを乾燥させた。乾燥時間の範囲は、2時間から1週間とした。

## 【0671】

細胞接着分子は、上記複合体形成時に使用してもよいが、本実施例では、スポッティングの直前に使用する形態も試験した。

## 【0672】

(混合液の調製および固相支持体への適用)

エッペンドルフチューブに、 $300\mu\text{L}$ のDNA濃縮緩衝液(EC緩衝液) +  $16\mu\text{L}$ のエンハンサーを混合した。これをボルテックスによって混合し、5分間インキュベートした。 $50\mu\text{L}$ のトランスフェクション試薬(Effectedeneなど)を加え、そしてピペティングによって混合した。トランスフェクション試薬を適用するために、スライドのスポットのまわりにワックス環状バリエーを引いた。スポットのワックスで囲まれた領域に $366\mu\text{L}$ の混合物を加え、室温で10から20分間インキュベートした。これにより、支持体への手動による固定が達成された。

## 【0673】

(細胞の分配)

次に、細胞を添加するプロトコルを示す。トランスフェクトのために細胞を分配した。この分配は、通常、フード内で試薬を減圧吸引して行った。スライドを皿に置き、そしてトランスフェクションのために細胞を含む溶液を加えた。細胞の分配は、以下のとおりである。

## 【0674】

細胞の濃度が $25\text{mL}$ 中 $10^7$ 細胞になるように、増殖中の細胞を分配した。四角の $100\times 100\times 15\text{mm}$ のペトリ皿または半径 $100\text{mm}\times 15\text{mm}$ の円形ディッシュ中で、スライド上に細胞をプレーティングした。約40時間、トランスフェクションを進行させた。これは、約2細胞周期にあたる。免疫蛍光のためにスライドを処理した。

## 【0675】

(遺伝子導入の評価)

遺伝子導入の評価は、例えば、免疫蛍光、蛍光顕微鏡検査、レーザー走査、またはエマルジョンを用いた検出によって達成した。

## 【0676】

可視化されるべき発現されたタンパク質が蛍光タンパク質であるなら、それらを蛍光顕微鏡検査で見てそして写真を撮ることができる。大きな発現アレイに関しては、スライドをデータ保存のためにレーザースキャナーで走査し得る。あるいは、カルシウムの場合のように、特異的な蛍光で検出可能な場合は、その蛍光を検出することによってシグナルを検出することができる。発現されたタンパク質を蛍光抗体が検出し得るなら、免疫蛍光のプロトコールを引き続いて行うことができる。

## 【0677】

(レーザ走査および蛍光強度定量)

トランスフェクション効率を定量するために、本発明者らは、DNAマイクロアレイスキャナ (GeneTAC UC4×4、Genomic Solutions Inc., MI) を使用した。総蛍光強度 (任意の単位) を測定した後、表面積あたりの蛍光強度を計算した。

## 【0678】

(共焦点顕走査顕微鏡による切片観察)

使用した細胞を、組織培養ディッシュに最終濃度  $1 \times 10^5$  細胞/ウェルで播種し、適切な培地を用いて (ヒト間葉系細胞の場合ヒト間葉系細胞基本培地 (MSCGM, BulletKit PT-3001, Cambrex BioScience Walkersville, Inc., MD, USA) を用いた) 培養した。細胞層を4%パラホルムアルデヒド溶液で固定した後、染色試薬であるSYTOおよびTexas Red-Xファロイジン (Molecular Probes Inc., OR, USA) を細胞層に添加して、核およびFアクチンを観察する。遺伝子産物によって発色するサンプルまたは染色されたサンプルを共焦点レーザ顕微鏡 (LSM510, Carl Zeiss Co., Ltd、ピンホールサイズ =  $Ch1 = 123 \mu m$ 、 $Ch2 = 108 \mu m$ ; 画像間隔 = 0.4) を用いて、切片像を得る。

## 【0679】

次に、嗅覚レセプターをレセプター-リガンドの相互作用の観察のための資料として、本発明のセンサに応用した実施例を示す。予備的実験を行ったところ、

嗅覚レセプターでもトランスフェクションアレイを用いることが可能であることが判明した。

### 【0680】

嗅覚レセプター発現ベクター群をレセプター種毎にスポットし、アレイ状にしたカバーガラスを信号測定用チャンバーにネジなどで固定し、その上に性質がほぼ均一な細胞を培養しておいた。信号測定用チャンバーは、公知の構造 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96(1999): 4040-4045など) にサンプルガスを導入した。その他の工夫をしたものもまた企図される。応答測定中は培養液を一定の速度で流しておいた。培養液が培養液供給チューブの開口から測定用チャンバーに供給され、測定部天井用カバーガラス上への培養液の進入を防止する壁に達するまでの区間の上部のなるべく液面に近い位置に、サンプルガスがこの区間を流れる培養液に吹き付けられるようにサンプルガス供給チューブを固定しておいた。このサンプルガス供給チューブはテフロン (登録商標)、ピークなど親油性の匂い物質、埃の吸着しにくい材料で作られていることが好ましかった。また、サンプルガスを導入するとき以外の時間は、チューブ内の残留サンプルガスを除去し、内部をなるべく清浄に保つために、途中で3方弁あるいは無臭空気供給チューブとの接続部での無臭空気供給チューブ側に逆止弁などを設けて無臭空気でチューブのなるべく広範な長さを洗浄できるようにしておく効果が高かったが、必要というわけではなかった。サンプルガスを0.5~4秒間の適当な時間だけ外部から導入するとき以外は、外部のガス採取開口に近いサンプルガス供給チューブの途中から無臭空気を導入し、チューブ内を洗浄する一方でサンプルガスと同様に培養液に吹き付け、測定チャンバー内の残留ガスの排除を促進するようにしても実施され得た。天井用カバーガラス支持用ベースはテフロン (登録商標) など撥水製の不透明プラスチックで作成する。培養液の流れる流路幅は、アレイの幅の2倍程度とし、その中心にアレイが配置されるようにしておく。培養液供給チューブおよびオーバーフロー培養液吸引チューブは、測定チャンバー側の開口部から数ミリの長さ分はステンレスなど親水性が高く変形しにくい材料を用いる。両者のチューブの開口部からアレイ側に向けて、培養液が流れる天井用カバーガラス支持用ベース上の部分は親水性を十分に持たせるために、コーティングをするかレ



ンズペーパー片などを固定した。吸引のための陰圧は、培養液の吸い込みにより生じる音による振動が測定に影響を与えない程度に調整しておいた。

#### 【0681】

一般的にベクターにより導入された遺伝子が発現する2日後には応答の測定が可能であった。天井用カバーガラスは測定時にのみ必要になるため、遺伝子が発現させるまでの培養中は設置不要であり、遺伝子が発現し蛍光変化計測系に測定用チャンバーを設置する際に、培養液進入防止壁と一体化させた天井用カバーガラス、天井用カバーガラス支持用ベースを測定用チャンバーに付加しても実施し得た。また、同遺伝子が発現させるまでの培養中は、培養液供給チューブとオーバーフロー培養液吸引チューブを用いずに培養液を交換しても実施し得た。培養液は、応答計測を行わず培養のみしている期間は、数時間～1日に1回程度の頻度で培養液の10ml程度の分量が供給され交換されるようにした。

#### 【0682】

匂い応答の大きさは、細胞にカルシウムイオン感受性蛍光色素fura-2などを取り込ませておき、高感度ビデオカメラなど2次元撮像素子を用いることで光学的に計測することが可能であった。測定間隔は1/3秒～1秒程度で応答の立ち上がりと回復の時定数を評価できる時間分解能を持たせることが望ましいが、平均的な応答時間曲線あるいはその理論式が得られている場合は、刺激後5秒、10秒、15秒、20秒、25秒の5秒間隔の5点での計測結果から実際の変化を推定し、得られる応答開始時期、応答立ち上がり・回復の時定数の推定値を指標として信号が匂いにより引き起こされたものか細胞の自発的活動あるいは他の異常により生じているものかなどを評価することもできた。このような評価は、すべて、細胞のプロファイルとして取得することが可能であった。

本実施例では、具体的なパラメータとして、嗅覚受容細胞(olfactory receptor neuron)において、発現している嗅覚レセプターの応答をカルシウム感受性蛍光色素の蛍光強度変化の測定により調べた。蛍光強度の減少が嗅覚レセプターの応答に対応する。刺激源として、図中に示した略号の匂い分子をその上に示した濃度で培養液に加えて、バーで示す時間だけ(4秒間あるいは2秒間)細胞に投与した。この例からも分かるように、同時に調製された細胞で同時に測定された応

答では、応答の時間特性、細胞毎の異なる刺激に対する応答閾値濃度および応答振幅の相対値の共通性が高いが、異なる時期に調整された細胞では、多少の相違が見られた。これらの結果は、調整条件を同じにし、サンプルガスが均一に投与されるサイズにアレイ化したセンサによって匂い応答を計測することによって、最も測定の信頼性を高めることが可能になることを示している。

#### 【0683】

このように、本発明において、嗅覚レセプターーリガンド（嗅覚物質）を用いても、細胞のプロファイルを取得することができることがわかった。

#### 【0684】

（実施例 14：データ生成）

実施例 5～13 において生成したデータは、実施例 4 に記載したのと同様に、適宜改変を加えた数理解析を用いて解析することができる。そのようなデータは、種々の形態をもって提示することができることが実証された。

#### 【0685】

以上のように、本発明の好ましい実施形態を用いて本発明を例示してきたが、本発明は、特許請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。本明細書において引用した特許、特許出願および文献は、その内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。

#### 【0686】

##### 【発明の効果】

本発明により、驚くべきほど少ない因子を観察することによって、細胞の状態を判定することが可能になった。このような判定により、診断、予防、治療に応用することが可能となり、その応用範囲は医療のみならず、食品、化粧品、農業、環境など種々の分野に及ぶ。

#### 【0687】

（配列の説明）

配列番号 1：フィブロネクチンの核酸配列（ヒト）

配列番号 2：フィブロネクチンのアミノ酸配列（ヒト）

- 配列番号3：ビトロネクチンの核酸配列（マウス）
- 配列番号4：ビトロネクチンのアミノ酸配列（マウス）
- 配列番号5：ラミニンの核酸配列（マウス $\alpha$ 鎖）
- 配列番号6：ラミニンのアミノ酸配列（マウス $\alpha$ 鎖）
- 配列番号7：ラミニンの核酸配列（マウス $\beta$ 鎖）
- 配列番号8：ラミニンのアミノ酸配列（マウス $\beta$ 鎖）
- 配列番号9：ラミニンの核酸配列（マウス $\gamma$ 鎖）
- 配列番号10：ラミニンのアミノ酸配列（マウス $\gamma$ 鎖）
- 配列番号11：フィブロネクチンのアミノ酸配列（ウシ）
- 配列番号12：実施例で使用する s i R N A
- 配列番号13：マウスの嗅覚レセプター I 7 (h e p t a n a l - s e n s i t i v e) の核酸 (G e n b a n k 登録番号 (A c c e s s i o n N u m b e r) A F 1 0 6 0 0 7)
- 配列番号14：配列番号13に記載の核酸にコードされるタンパク質
- 配列番号15：マウスの嗅覚レセプター S 1 (m c 9 / b c 9 - e q u i - s e n s i t i v e) の核酸 (G e n b a n k 登録番号 A F 1 2 1 9 7 2)
- 配列番号16：配列番号15に記載の核酸にコードされるタンパク質
- 配列番号17：マウスの嗅覚レセプター S 5 0 (c c 9 - s e n s i t i v e) の核酸 (G e n b a n k 登録番号 A F 1 2 1 9 8 0)
- 配列番号18：配列番号17に記載の核酸にコードされるタンパク質
- 配列番号19：マウスの嗅覚レセプター S 1 9 (m c 9 / m h 9 / b c 9 - e q u i - s e n s i t i v e) の核酸 (G e n b a n k 登録番号 A F 1 2 1 9 7 6)
- 配列番号20：配列番号19に記載の核酸にコードされるタンパク質
- 配列番号21：マウスの O R 2 3 (l y r a l - s e n s i t i v e) (G e n b a n k 登録番号 X 9 2 9 6 9 のコード領域のみ) の核酸
- 配列番号22：配列番号21に記載の核酸にコードされるタンパク質
- 配列番号23：マウスの嗅覚レセプターについての m O R - E V (v a n i l l i n - s e n s i t i v e) の核酸 (G e n b a n k 登録番号 A B 0 6 1 2 2

9)

配列番号24: 配列番号23に記載の核酸にコードされるタンパク質

配列番号25: マウスのor37aの核酸 (Genbank登録番号AJ133424)

配列番号26: 配列番号25に記載の核酸にコードされるタンパク質

配列番号27: マウスの嗅覚レセプターC6の核酸 (Genbank登録番号AF102523)

配列番号28: 配列番号27に記載の核酸にコードされるタンパク質

配列番号29: マウスの嗅覚レセプターF5の核酸 (Genbank登録番号AF102531)

配列番号30: 配列番号29に記載の核酸にコードされるタンパク質

配列番号31: マウスの嗅覚レセプターS6の核酸 (Genbank登録番号AF121974)

配列番号32: 配列番号31に記載の核酸にコードされるタンパク質

配列番号33: マウスの嗅覚レセプターS18の核酸 (Genbank登録番号AF121975)

配列番号34: 配列番号33に記載の核酸にコードされるタンパク質

配列番号35: マウスの嗅覚レセプターS25の核酸 (Genbank登録番号AF121977)

配列番号36: 配列番号35に記載の核酸にコードされるタンパク質

配列番号37: マウスの嗅覚レセプターS46の核酸 (Genbank登録番号AF121979)

配列番号38: 配列番号37に記載の核酸にコードされるタンパク質

配列番号39: マウスのGタンパク質 $\alpha$ サブユニットの核酸 (Genbank登録番号M36778)

配列番号40: 配列番号39に記載の核酸にコードされるタンパク質

配列番号41: マウスのGタンパク質 $\beta$ サブユニットの核酸 (Genbank登録番号M87286)

配列番号42: 配列番号41に記載の核酸にコードされるタンパク質

答では、応答の時間特性、細胞毎の異なる刺激に対する応答閾値濃度および応答振幅の相対値の共通性が高いが、異なる時期に調整された細胞では、多少の相違が見られた。これらの結果は、調整条件を同じにし、サンプルガスが均一に投与されるサイズにアレイ化したセンサによって匂い応答を計測することによって、最も測定信頼性を高めることが可能になることを示している。

#### 【0683】

このように、本発明において、嗅覚レセプターーリガンド（嗅覚物質）を用いても、細胞のプロファイルを取得することができることがわかった。

#### 【0684】

（実施例 14：データ生成）

実施例 5～13 において生成したデータは、実施例 4 に記載したのと同様に、適宜改変を加えた数理解析を用いて解析することができる。そのようなデータは、種々の形態をもって提示することができることが実証された。

#### 【0685】

以上のように、本発明の好ましい実施形態を用いて本発明を例示してきたが、本発明は、特許請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。本明細書において引用した特許、特許出願および文献は、その内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。

#### 【0686】

##### 【発明の効果】

本発明により、驚くべきほど少ない因子を観察することによって、細胞の状態を判定することが可能になった。このような判定により、診断、予防、治療に応用することが可能となり、その応用範囲は医療のみならず、食品、化粧品、農業、環境など種々の分野に及ぶ。

#### 【0687】

（配列の説明）

配列番号 1：フィブロネクチンの核酸配列（ヒト）

配列番号 2：フィブロネクチンのアミノ酸配列（ヒト）

- 配列番号3：ビトロネクチンの核酸配列（マウス）
- 配列番号4：ビトロネクチンのアミノ酸配列（マウス）
- 配列番号5：ラミニンの核酸配列（マウス $\alpha$ 鎖）
- 配列番号6：ラミニンのアミノ酸配列（マウス $\alpha$ 鎖）
- 配列番号7：ラミニンの核酸配列（マウス $\beta$ 鎖）
- 配列番号8：ラミニンのアミノ酸配列（マウス $\beta$ 鎖）
- 配列番号9：ラミニンの核酸配列（マウス $\gamma$ 鎖）
- 配列番号10：ラミニンのアミノ酸配列（マウス $\gamma$ 鎖）
- 配列番号11：フィブロネクチンのアミノ酸配列（ウシ）
- 配列番号12：実施例で使用する siRNA
- 配列番号13：マウスの嗅覚レセプター I7 (heptanal-sensitive) の核酸 (Genbank登録番号 (Accession Number) AF106007)
- 配列番号14：配列番号13に記載の核酸にコードされるタンパク質
- 配列番号15：マウスの嗅覚レセプター S1 (mc9/bc9-equi-sensitive) の核酸 (Genbank登録番号 AF121972)
- 配列番号16：配列番号15に記載の核酸にコードされるタンパク質
- 配列番号17：マウスの嗅覚レセプター S50 (cc9-sensitive) の核酸 (Genbank登録番号 AF121980)
- 配列番号18：配列番号17に記載の核酸にコードされるタンパク質
- 配列番号19：マウスの嗅覚レセプター S19 (mc9/mh9/bc9-equi-sensitive) の核酸 (Genbank登録番号 AF121976)
- 配列番号20：配列番号19に記載の核酸にコードされるタンパク質
- 配列番号21：マウスの OR23 (lyral-sensitive) (Genbank登録番号 X92969のコード領域のみ) の核酸
- 配列番号22：配列番号21に記載の核酸にコードされるタンパク質
- 配列番号23：マウスの嗅覚レセプターについての mOR-EV (vanillin-sensitive) の核酸 (Genbank登録番号 AB06122

9)

配列番号 24 : 配列番号 23 に記載の核酸にコードされるタンパク質

配列番号 25 : マウスの or37a の核酸 (Genbank 登録番号 AJ133424)

配列番号 26 : 配列番号 25 に記載の核酸にコードされるタンパク質

配列番号 27 : マウスの嗅覚レセプター C6 の核酸 (Genbank 登録番号 AF102523)

配列番号 28 : 配列番号 27 に記載の核酸にコードされるタンパク質

配列番号 29 : マウスの嗅覚レセプター F5 の核酸 (Genbank 登録番号 AF102531)

配列番号 30 : 配列番号 29 に記載の核酸にコードされるタンパク質

配列番号 31 : マウスの嗅覚レセプター S6 の核酸 (Genbank 登録番号 AF121974)

配列番号 32 : 配列番号 31 に記載の核酸にコードされるタンパク質

配列番号 33 : マウスの嗅覚レセプター S18 の核酸 (Genbank 登録番号 AF121975)

配列番号 34 : 配列番号 33 に記載の核酸にコードされるタンパク質

配列番号 35 : マウスの嗅覚レセプター S25 の核酸 (Genbank 登録番号 AF121977)

配列番号 36 : 配列番号 35 に記載の核酸にコードされるタンパク質

配列番号 37 : マウスの嗅覚レセプター S46 の核酸 (Genbank 登録番号 AF121979)

配列番号 38 : 配列番号 37 に記載の核酸にコードされるタンパク質

配列番号 39 : マウスの G タンパク質  $\alpha$  サブユニットの核酸 (Genbank 登録番号 M36778)

配列番号 40 : 配列番号 39 に記載の核酸にコードされるタンパク質

配列番号 41 : マウスの G タンパク質  $\beta$  サブユニットの核酸 (Genbank 登録番号 M87286)

配列番号 42 : 配列番号 41 に記載の核酸にコードされるタンパク質

配列番号 43 : マウスの G タンパク質  $\gamma$  サブユニットの核酸 (Genbank  
登録番号 U37527)

配列番号 44 : 配列番号 43 に記載の核酸にコードされるタンパク質

配列番号 45 : マウスの上皮増殖因子 (EGF) レセプターの核酸 (Genbank  
登録番号 BC023729)

配列番号 46 : 配列番号 45 に記載の核酸にコードされるタンパク質

【0688】

【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

<110> Tissue Engineering Research Center, AIST

<120> Method and apparatus for producing cell profile data

<130> J1-03624054

<160> 46

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1929

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1929)

<223> fibronectin 1



&lt;400&gt; 1

atg ctt agg ggt ccg ggg ccc ggg ctg ctg ctg ctg gcc gtc cag tgc 48  
 Met Leu Arg Gly Pro Gly Pro Gly Leu Leu Leu Leu Ala Val Gln Cys  
 1 5 10 15

ctg ggg aca gcg gtg ccc tcc acg gga gcc tcg aag agc aag agg cag 96  
 Leu Gly Thr Ala Val Pro Ser Thr Gly Ala Ser Lys Ser Lys Arg Gln  
 20 25 30

gct cag caa atg gtt cag ccc cag tcc ccg gtg gct gtc agt caa agc 144  
 Ala Gln Gln Met Val Gln Pro Gln Ser Pro Val Ala Val Ser Gln Ser  
 35 40 45

aag ccc ggt tgt tat gac aat gga aaa cac tat cag ata aat caa cag 192  
 Lys Pro Gly Cys Tyr Asp Asn Gly Lys His Tyr Gln Ile Asn Gln Gln  
 50 55 60

tgg gag cgg acc tac cta ggc aat gcg ttg gtt tgt act tgt tat gga 240  
 Trp Glu Arg Thr Tyr Leu Gly Asn Ala Leu Val Cys Thr Cys Tyr Gly  
 65 70 75 80

gga agc cga ggt ttt aac tgc gag agt aaa cct gaa gct gaa gag act 288  
 Gly Ser Arg Gly Phe Asn Cys Glu Ser Lys Pro Glu Ala Glu Glu Thr  
 85 90 95

tgc ttt gac aag tac act ggg aac act tac cga gtg ggt gac act tat 336  
 Cys Phe Asp Lys Tyr Thr Gly Asn Thr Tyr Arg Val Gly Asp Thr Tyr

100	105	110	
gag cgt cct aaa gac tcc atg atc tgg gac tgt acc tgc atc ggg gct			384
Glu Arg Pro Lys Asp Ser Met Ile Trp Asp Cys Thr Cys Ile Gly Ala			
115	120	125	
ggg cga ggg aga ata agc tgt acc atc gca aac cgc tgc cat gaa ggg			432
Gly Arg Gly Arg Ile Ser Cys Thr Ile Ala Asn Arg Cys His Glu Gly			
130	135	140	
ggt cag tcc tac aag att ggt gac acc tgg agg aga cca cat gag act			480
Gly Gln Ser Tyr Lys Ile Gly Asp Thr Trp Arg Arg Pro His Glu Thr			
145	150	155	160
ggt ggt tac atg tta gag tgt gtg tgt ctt ggt aat gga aaa gga gaa			528
Gly Gly Tyr Met Leu Glu Cys Val Cys Leu Gly Asn Gly Lys Gly Glu			
165	170	175	
tgg acc tgc aag ccc ata gct gag aag tgt ttt gat cat gct gct ggg			576
Trp Thr Cys Lys Pro Ile Ala Glu Lys Cys Phe Asp His Ala Ala Gly			
180	185	190	
act tcc tat gtg gtc gga gaa acg tgg gag aag ccc tac caa ggc tgg			624
Thr Ser Tyr Val Val Gly Glu Thr Trp Glu Lys Pro Tyr Gln Gly Trp			
195	200	205	

atg atg gta gat tgt act tgc ctg gga gaa ggc agc gga cgc atc act 672  
Met Met Val Asp Cys Thr Cys Leu Gly Glu Gly Ser Gly Arg Ile Thr  
210 215 220

tgc act tct aga aat aga tgc aac gat cag gac aca agg aca tcc tat 720  
Cys Thr Ser Arg Asn Arg Cys Asn Asp Gln Asp Thr Arg Thr Ser Tyr  
225 230 235 240

aga att gga gac acc tgg agc aag aag gat aat cga gga aac ctg ctc 768  
Arg Ile Gly Asp Thr Trp Ser Lys Lys Asp Asn Arg Gly Asn Leu Leu  
245 250 255

cag tgc atc tgc aca ggc aac ggc cga gga gag tgg aag tgt gag agg 816  
Gln Cys Ile Cys Thr Gly Asn Gly Arg Gly Glu Trp Lys Cys Glu Arg  
260 265 270

cac acc tct gtg cag acc aca tcg agc gga tct ggc ccc ttc acc gat 864  
His Thr Ser Val Gln Thr Thr Ser Ser Gly Ser Gly Pro Phe Thr Asp  
275 280 285

gtt cgt gca gct gtt tac caa ccg cag cct cac ccc cag cct cct ccc 912  
Val Arg Ala Ala Val Tyr Gln Pro Gln Pro His Pro Gln Pro Pro Pro  
290 295 300

tat ggc cac tgt gtc aca gac agt ggt gtg gtc tac tct gtg ggg atg 960  
Tyr Gly His Cys Val Thr Asp Ser Gly Val Val Tyr Ser Val Gly Met  
305 310 315 320

cag tgg ctg aag aca caa gga aat aag caa atg ctt tgc acg tgc ctg 1008  
 Gln Trp Leu Lys Thr Gln Gly Asn Lys Gln Met Leu Cys Thr Cys Leu  
 325 330 335

ggc aac gga gtc agc tgc caa gag aca gct gta acc cag act tac ggt 1056  
 Gly Asn Gly Val Ser Cys Gln Glu Thr Ala Val Thr Gln Thr Tyr Gly  
 340 345 350

ggc aac tca aat gga gag cca tgt gtc tta cca ttc acc tac aat ggc 1104  
 Gly Asn Ser Asn Gly Glu Pro Cys Val Leu Pro Phe Thr Tyr Asn Gly  
 355 360 365

agg acg gac agc aca act tcg aat tat gag cag gac cag aaa tac tct 1152  
 Arg Thr Asp Ser Thr Thr Ser Asn Tyr Glu Gln Asp Gln Lys Tyr Ser  
 370 375 380

ttc tgc aca gac cac act gtt ttg gtt cag act cga gga gga aat tcc 1200  
 Phe Cys Thr Asp His Thr Val Leu Val Gln Thr Arg Gly Gly Asn Ser  
 385 390 395 400

aat ggt gcc ttg tgc cac ttc ccc ttc cta tac aac aac cac aat tac 1248  
 Asn Gly Ala Leu Cys His Phe Pro Phe Leu Tyr Asn Asn His Asn Tyr  
 405 410 415

act gat tgc act tct gag ggc aga aga gac aac atg aag tgg tgt ggg 1296  
 Thr Asp Cys Thr Ser Glu Gly Arg Arg Asp Asn Met Lys Trp Cys Gly  
 420 425 430

acc aca cag aac tat gat gcc gac cag aag ttt ggg ttc tgc ccc atg 1344

Thr Thr Gln Asn Tyr Asp Ala Asp Gln Lys Phe Gly Phe Cys Pro Met  
 435 440 445

gct gcc cac gag gaa atc tgc aca acc aat gaa ggg gtc atg tac cgc 1392  
 Ala Ala His Glu Glu Ile Cys Thr Thr Asn Glu Gly Val Met Tyr Arg  
 450 455 460

att gga gat cag tgg gat aag cag cat gac atg ggt cac atg atg agg 1440  
 Ile Gly Asp Gln Trp Asp Lys Gln His Asp Met Gly His Met Met Arg  
 465 470 475 480

tgc acg tgt gtt ggg aat ggt cgt ggg gaa tgg aca tgc att gcc tac 1488  
 Cys Thr Cys Val Gly Asn Gly Arg Gly Glu Trp Thr Cys Ile Ala Tyr  
 485 490 495

tgc cag ctt cga gat cag tgc att gtt gat gac atc act tac aat gtg 1536  
 Ser Gln Leu Arg Asp Gln Cys Ile Val Asp Asp Ile Thr Tyr Asn Val  
 500 505 510

aac gac aca ttc cac aag cgt cat gaa gag ggg cac atg ctg aac tgt 1584  
 Asn Asp Thr Phe His Lys Arg His Glu Glu Gly His Met Leu Asn Cys  
 515 520 525

aca tgc ttc ggt cag ggt cgg ggc agg tgg aag tgt gat ccc gtc gac 1632  
 Thr Cys Phe Gly Gln Gly Arg Gly Arg Trp Lys Cys Asp Pro Val Asp  
 530 535 540

caa tgc cag gat tca gag act ggg acg ttt tat caa att gga gat tca 1680  
 Gln Cys Gln Asp Ser Glu Thr Gly Thr Phe Tyr Gln Ile Gly Asp Ser

545	550	555	560	
tgg gag aag tat gtg cat ggt gtc aga tac cag tgc tac tgc tat ggc				1728
Trp Glu Lys Tyr Val His Gly Val Arg Tyr Gln Cys Tyr Cys Tyr Gly				
	565	570	575	
cgt ggc att ggg gag tgg cat tgc caa cct tta cag acc tat cca agc				1776
Arg Gly Ile Gly Glu Trp His Cys Gln Pro Leu Gln Thr Tyr Pro Ser				
	580	585	590	
tca agt ggt cct gtc gaa gta ttt atc act gag act ccg agt cag ccc				1824
Ser Ser Gly Pro Val Glu Val Phe Ile Thr Glu Thr Pro Ser Gln Pro				
	595	600	605	
aac tcc cac ccc atc cag tgg aat gca cca cag cca tct cac att tcc				1872
Asn Ser His Pro Ile Gln Trp Asn Ala Pro Gln Pro Ser His Ile Ser				
	610	615	620	
aag tac att ctc agg tgg aga cct gtg agt atc cca ccc aga aac ctt				1920
Lys Tyr Ile Leu Arg Trp Arg Pro Val Ser Ile Pro Pro Arg Asn Leu				
	625	630	635	640
gga tac tga				1929
Gly Tyr				

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 642

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Met Leu Arg Gly Pro Gly Pro Gly Leu Leu Leu Leu Ala Val Gln Cys

1 5 10 15

Leu Gly Thr Ala Val Pro Ser Thr Gly Ala Ser Lys Ser Lys Arg Gln

20 25 30

Ala Gln Gln Met Val Gln Pro Gln Ser Pro Val Ala Val Ser Gln Ser

35 40 45

Lys Pro Gly Cys Tyr Asp Asn Gly Lys His Tyr Gln Ile Asn Gln Gln

50 55 60

Trp Glu Arg Thr Tyr Leu Gly Asn Ala Leu Val Cys Thr Cys Tyr Gly

65 70 75 80

Gly Ser Arg Gly Phe Asn Cys Glu Ser Lys Pro Glu Ala Glu Glu Thr

85 90 95

Cys Phe Asp Lys Tyr Thr Gly Asn Thr Tyr Arg Val Gly Asp Thr Tyr  
100 105 110

Glu Arg Pro Lys Asp Ser Met Ile Trp Asp Cys Thr Cys Ile Gly Ala  
115 120 125

Gly Arg Gly Arg Ile Ser Cys Thr Ile Ala Asn Arg Cys His Glu Gly  
130 135 140

Gly Gln Ser Tyr Lys Ile Gly Asp Thr Trp Arg Arg Pro His Glu Thr  
145 150 155 160

Gly Gly Tyr Met Leu Glu Cys Val Cys Leu Gly Asn Gly Lys Gly Glu  
165 170 175

Trp Thr Cys Lys Pro Ile Ala Glu Lys Cys Phe Asp His Ala Ala Gly  
180 185 190

Thr Ser Tyr Val Val Gly Glu Thr Trp Glu Lys Pro Tyr Gln Gly Trp  
195 200 205

Met Met Val Asp Cys Thr Cys Leu Gly Glu Gly Ser Gly Arg Ile Thr



210

215

220

Cys Thr Ser Arg Asn Arg Cys Asn Asp Gln Asp Thr Arg Thr Ser Tyr

225

230

235

240

Arg Ile Gly Asp Thr Trp Ser Lys Lys Asp Asn Arg Gly Asn Leu Leu

245

250

255

Gln Cys Ile Cys Thr Gly Asn Gly Arg Gly Glu Trp Lys Cys Glu Arg

260

265

270

His Thr Ser Val Gln Thr Thr Ser Ser Gly Ser Gly Pro Phe Thr Asp

275

280

285

Val Arg Ala Ala Val Tyr Gln Pro Gln Pro His Pro Gln Pro Pro Pro

290

295

300

Tyr Gly His Cys Val Thr Asp Ser Gly Val Val Tyr Ser Val Gly Met

305

310

315

320

Gln Trp Leu Lys Thr Gln Gly Asn Lys Gln Met Leu Cys Thr Cys Leu

325

330

335

Gly Asn Gly Val Ser Cys Gln Glu Thr Ala Val Thr Gln Thr Tyr Gly  
340 345 350

Gly Asn Ser Asn Gly Glu Pro Cys Val Leu Pro Phe Thr Tyr Asn Gly  
355 360 365

Arg Thr Asp Ser Thr Thr Ser Asn Tyr Glu Gln Asp Gln Lys Tyr Ser  
370 375 380

Phe Cys Thr Asp His Thr Val Leu Val Gln Thr Arg Gly Gly Asn Ser  
385 390 395 400

Asn Gly Ala Leu Cys His Phe Pro Phe Leu Tyr Asn Asn His Asn Tyr  
405 410 415

Thr Asp Cys Thr Ser Glu Gly Arg Arg Asp Asn Met Lys Trp Cys Gly  
420 425 430

Thr Thr Gln Asn Tyr Asp Ala Asp Gln Lys Phe Gly Phe Cys Pro Met  
435 440 445

Ala Ala His Glu Glu Ile Cys Thr Thr Asn Glu Gly Val Met Tyr Arg  
450 455 460

Ile Gly Asp Gln Trp Asp Lys Gln His Asp Met Gly His Met Met Arg  
465 470 475 480

Cys Thr Cys Val Gly Asn Gly Arg Gly Glu Trp Thr Cys Ile Ala Tyr  
485 490 495

Ser Gln Leu Arg Asp Gln Cys Ile Val Asp Asp Ile Thr Tyr Asn Val  
500 505 510

Asn Asp Thr Phe His Lys Arg His Glu Glu Gly His Met Leu Asn Cys  
515 520 525

Thr Cys Phe Gly Gln Gly Arg Gly Arg Trp Lys Cys Asp Pro Val Asp  
530 535 540

Gln Cys Gln Asp Ser Glu Thr Gly Thr Phe Tyr Gln Ile Gly Asp Ser  
545 550 555 560

Trp Glu Lys Tyr Val His Gly Val Arg Tyr Gln Cys Tyr Cys Tyr Gly  
565 570 575

Arg Gly Ile Gly Glu Trp His Cys Gln Pro Leu Gln Thr Tyr Pro Ser  
580 585 590

Ser Ser Gly Pro Val Glu Val Phe Ile Thr Glu Thr Pro Ser Gln Pro  
595 600 605

Asn Ser His Pro Ile Gln Trp Asn Ala Pro Gln Pro Ser His Ile Ser  
610 615 620

Lys Tyr Ile Leu Arg Trp Arg Pro Val Ser Ile Pro Pro Arg Asn Leu  
625 630 635 640

Gly Tyr

<210> 3

<211> 1437

<212> DNA

<213> Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1437)

&lt;223&gt; vitronectin

&lt;400&gt; 3

atg gca ccc ctg agg ccc ttt ttc ata cta gcc ctg gtg gca tgg gtt 48  
Met Ala Pro Leu Arg Pro Phe Phe Ile Leu Ala Leu Val Ala Trp Val  
1 5 10 15

tct ctg gct gac caa gag tca tgc aag ggc cgc tgc act cag ggt ttc 96  
Ser Leu Ala Asp Gln Glu Ser Cys Lys Gly Arg Cys Thr Gln Gly Phe  
20 25 30

atg gcc agc aag aag tgt cag tgt gac gag ctt tgc act tac tat cag 144  
Met Ala Ser Lys Lys Cys Gln Cys Asp Glu Leu Cys Thr Tyr Tyr Gln  
35 40 45

agc tgc tgt gcc gac tac atg gag cag tgc aag ccc caa gta acg cgg 192  
Ser Cys Cys Ala Asp Tyr Met Glu Gln Cys Lys Pro Gln Val Thr Arg  
50 55 60

ggg gac gtg ttc act atg cca gag gat gat tat tgg agc tat gac tac 240  
Gly Asp Val Phe Thr Met Pro Glu Asp Asp Tyr Trp Ser Tyr Asp Tyr  
65 70 75 80

gtg gag gag ccc aag aac aat acc aac acc ggt gtg caa ccc gag aac 288  
Val Glu Glu Pro Lys Asn Asn Thr Asn Thr Gly Val Gln Pro Glu Asn

85	90	95	
acc tct cca ccc ggt gac cta aat cct cgg acg gac ggc act cta aag			336
Thr Ser Pro Pro Gly Asp Leu Asn Pro Arg Thr Asp Gly Thr Leu Lys			
100	105	110	
ccg aca gcc ttc cta gat cct gag gaa cag cca agc acc cca gcg cct			384
Pro Thr Ala Phe Leu Asp Pro Glu Glu Gln Pro Ser Thr Pro Ala Pro			
115	120	125	
aaa gtg gag caa cag gag gag atc cta agg ccc gac acc act gat caa			432
Lys Val Glu Gln Gln Glu Glu Ile Leu Arg Pro Asp Thr Thr Asp Gln			
130	135	140	
ggg acc cct gag ttt cca gag gaa gaa ctg tgc agt gga aag ccc ttt			480
Gly Thr Pro Glu Phe Pro Glu Glu Glu Leu Cys Ser Gly Lys Pro Phe			
145	150	155	160
gac gcc ttc acg gat ctc aag aat ggg tcc ctc ttt gcc ttc cga ggg			528
Asp Ala Phe Thr Asp Leu Lys Asn Gly Ser Leu Phe Ala Phe Arg Gly			
165	170	175	
cag tac cgc tgt gag cta gat gag acg gca gtg agg cct ggg tac ccc			576
Gln Tyr Arg Cys Glu Leu Asp Glu Thr Ala Val Arg Pro Gly Tyr Pro			
180	185	190	
aaa ctt atc caa gat gtc tgg ggc att gag ggc ccc atc gat gct gcc			624
Lys Leu Ile Gln Asp Val Trp Gly Ile Glu Gly Pro Ile Asp Ala Ala			
195	200	205	

ttc act cgc atc aac tgt cag ggg aag acc tac ttg ttc aag ggt agt	672
Phe Thr Arg Ile Asn Cys Gln Gly Lys Thr Tyr Leu Phe Lys Gly Ser	
210 215 220	
cag tac tgg cgc ttt gag gat ggg gtc ctg gac cct ggt tat ccc cga	720
Gln Tyr Trp Arg Phe Glu Asp Gly Val Leu Asp Pro Gly Tyr Pro Arg	
225 230 235 240	
aac atc tcc gaa ggc ttc agt ggc ata cca gac aat gtt gat gca gcg	768
Asn Ile Ser Glu Gly Phe Ser Gly Ile Pro Asp Asn Val Asp Ala Ala	
245 250 255	
ttc gcc ctt cct gcc cac cgt tac agt ggc cgg gaa agg gtc tac ttc	816
Phe Ala Leu Pro Ala His Arg Tyr Ser Gly Arg Glu Arg Val Tyr Phe	
260 265 270	
ttc aag ggg aag cag tac tgg gag cac gaa ttt cag cag caa ccc agc	864
Phe Lys Gly Lys Gln Tyr Trp Glu His Glu Phe Gln Gln Gln Pro Ser	
275 280 285	
cag gag gag tgc gaa ggc agc tct ctg tca gcc gtg ttt gag cac ttt	912
Gln Glu Glu Cys Glu Gly Ser Ser Leu Ser Ala Val Phe Glu His Phe	
290 295 300	
gcc ttg ctt cag cgg gac agc tgg gag aac att ttc gaa ctc ctc ttc	960
Ala Leu Leu Gln Arg Asp Ser Trp Glu Asn Ile Phe Glu Leu Leu Phe	
305 310 315 320	

tgg ggc aga tcc tct gat gga gcc aga gaa ccc caa ttc atc agc cgg 1008  
Trp Gly Arg Ser Ser Asp Gly Ala Arg Glu Pro Gln Phe Ile Ser Arg  
325 330 335

aac tgg cat ggt gtg cca ggg aaa gtg gac gct gct atg gcc ggc cgc 1056  
Asn Trp His Gly Val Pro Gly Lys Val Asp Ala Ala Met Ala Gly Arg  
340 345 350

atc tac gtc act ggc tcc tta tcc cac tct gcc caa gcc aaa aaa cag 1104  
Ile Tyr Val Thr Gly Ser Leu Ser His Ser Ala Gln Ala Lys Lys Gln  
355 360 365

ccg tct aag cgt aga agc cga aag cgc tat cgt tca cgc cga ggg cgt 1152  
Pro Ser Lys Arg Arg Ser Arg Lys Arg Tyr Arg Ser Arg Arg Gly Arg  
370 375 380

ggc cac aga cgc agc cag agc tcg aac tcc cgt cgt tca tca cgt tca 1200  
Gly His Arg Arg Ser Gln Ser Ser Asn Ser Arg Arg Ser Ser Arg Ser  
385 390 395 400

atc tgg ttc tct ttg ttc tcc agc gag gag agt ggg cta gga acc tac 1248  
Ile Trp Phe Ser Leu Phe Ser Ser Glu Glu Ser Gly Leu Gly Thr Tyr  
405 410 415

aac aac tat gat tat gat atg gac tgg ctt gta cct gcc acc tgc gag 1296  
Asn Asn Tyr Asp Tyr Asp Met Asp Trp Leu Val Pro Ala Thr Cys Glu  
420 425 430

ccc att cag agc gtc tat ttc ttc tct gga gac aaa tac tac cga gtc 1344



Pro Ile Gln Ser Val Tyr Phe Phe Ser Gly Asp Lys Tyr Tyr Arg Val  
435 440 445

aac ctt aga acc cgg cga gtg gac tct gtg aat cct ccc tac cca cgc 1392  
Asn Leu Arg Thr Arg Arg Val Asp Ser Val Asn Pro Pro Tyr Pro Arg  
450 455 460

tcc att gct cag tat tgg ctg ggc tgc ccg acc tct gag aag tag 1437  
Ser Ile Ala Gln Tyr Trp Leu Gly Cys Pro Thr Ser Glu Lys  
465 470 475

<210> 4

<211> 478

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Met Ala Pro Leu Arg Pro Phe Phe Ile Leu Ala Leu Val Ala Trp Val  
1 5 10 15

Ser Leu Ala Asp Gln Glu Ser Cys Lys Gly Arg Cys Thr Gln Gly Phe  
20 25 30

Met Ala Ser Lys Lys Cys Gln Cys Asp Glu Leu Cys Thr Tyr Tyr Gln  
35 40 45

Ser Cys Cys Ala Asp Tyr Met Glu Gln Cys Lys Pro Gln Val Thr Arg  
50 55 60

Gly Asp Val Phe Thr Met Pro Glu Asp Asp Tyr Trp Ser Tyr Asp Tyr  
65 70 75 80

Val Glu Glu Pro Lys Asn Asn Thr Asn Thr Gly Val Gln Pro Glu Asn  
85 90 95

Thr Ser Pro Pro Gly Asp Leu Asn Pro Arg Thr Asp Gly Thr Leu Lys  
100 105 110

Pro Thr Ala Phe Leu Asp Pro Glu Glu Gln Pro Ser Thr Pro Ala Pro  
115 120 125

Lys Val Glu Gln Gln Glu Glu Ile Leu Arg Pro Asp Thr Thr Asp Gln  
130 135 140

Gly Thr Pro Glu Phe Pro Glu Glu Glu Leu Cys Ser Gly Lys Pro Phe  
145 150 155 160

Asp Ala Phe Thr Asp Leu Lys Asn Gly Ser Leu Phe Ala Phe Arg Gly  
165 170 175

Gln Tyr Arg Cys Glu Leu Asp Glu Thr Ala Val Arg Pro Gly Tyr Pro  
180 185 190

Lys Leu Ile Gln Asp Val Trp Gly Ile Glu Gly Pro Ile Asp Ala Ala  
195 200 205

Phe Thr Arg Ile Asn Cys Gln Gly Lys Thr Tyr Leu Phe Lys Gly Ser  
210 215 220

Gln Tyr Trp Arg Phe Glu Asp Gly Val Leu Asp Pro Gly Tyr Pro Arg  
225 230 235 240

Asn Ile Ser Glu Gly Phe Ser Gly Ile Pro Asp Asn Val Asp Ala Ala  
245 250 255

Phe Ala Leu Pro Ala His Arg Tyr Ser Gly Arg Glu Arg Val Tyr Phe  
260 265 270

Phe Lys Gly Lys Gln Tyr Trp Glu His Glu Phe Gln Gln Gln Pro Ser  
275 280 285

Gln Glu Glu Cys Glu Gly Ser Ser Leu Ser Ala Val Phe Glu His Phe  
290 295 300

Ala Leu Leu Gln Arg Asp Ser Trp Glu Asn Ile Phe Glu Leu Leu Phe  
305 310 315 320

Trp Gly Arg Ser Ser Asp Gly Ala Arg Glu Pro Gln Phe Ile Ser Arg  
325 330 335

Asn Trp His Gly Val Pro Gly Lys Val Asp Ala Ala Met Ala Gly Arg  
340 345 350

Ile Tyr Val Thr Gly Ser Leu Ser His Ser Ala Gln Ala Lys Lys Gln  
355 360 365

Pro Ser Lys Arg Arg Ser Arg Lys Arg Tyr Arg Ser Arg Arg Gly Arg  
370 375 380

Gly His Arg Arg Ser Gln Ser Ser Asn Ser Arg Arg Ser Ser Arg Ser

385                      390                      395                      400

Ile Trp Phe Ser Leu Phe Ser Ser Glu Glu Ser Gly Leu Gly Thr Tyr  
                                  405                      410                      415

Asn Asn Tyr Asp Tyr Asp Met Asp Trp Leu Val Pro Ala Thr Cys Glu  
                                  420                      425                      430

Pro Ile Gln Ser Val Tyr Phe Phe Ser Gly Asp Lys Tyr Tyr Arg Val  
                                  435                      440                      445

Asn Leu Arg Thr Arg Arg Val Asp Ser Val Asn Pro Pro Tyr Pro Arg  
                                  450                      455                      460

Ser Ile Ala Gln Tyr Trp Leu Gly Cys Pro Thr Ser Glu Lys  
                                  465                      470                      475

<210> 5

<211> 9511

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (121)..(9372)

&lt;223&gt; laminin-2 alpha chain

&lt;400&gt; 5

ggcacgagct gcaactccgt gggctccggg aggagtggat ctgctccggc caggatgcct 60

gcggccaccg ccgggatcct cttgctcctg ctcttgggga cgctcgaagg ctcccagact 120

cag cgg cga cag tcc caa gcg cat caa cag aga ggt tta ttt cct gct 168

Gln Arg Arg Gln Ser Gln Ala His Gln Gln Arg Gly Leu Phe Pro Ala

1 5 10 15

gtc ctg aat ctt gct tcg aat gca ctc atc aca acc aat gct aca tgt 216

Val Leu Asn Leu Ala Ser Asn Ala Leu Ile Thr Thr Asn Ala Thr Cys

20 25 30

ggg gaa aaa gga ccc gag atg tac tgc aag ttg gtg gaa cat gtc ccc 264

Gly Glu Lys Gly Pro Glu Met Tyr Cys Lys Leu Val Glu His Val Pro

35 40 45

ggg cag cct gtg agg aac cct cag tgc cga atc tgc aat cag aac agc 312

Gly Gln Pro Val Arg Asn Pro Gln Cys Arg Ile Cys Asn Gln Asn Ser

50 55 60

agc aat cca tac cag agg cac ccg att acg aat gct att gat ggc aag 360

Ser Asn Pro Tyr Gln Arg His Pro Ile Thr Asn Ala Ile Asp Gly Lys

65 70 75 80

aac aca tgg tgg cag agt ccc agt atc aag aat gga gtg gaa tac cat	408
Asn Thr Trp Trp Gln Ser Pro Ser Ile Lys Asn Gly Val Glu Tyr His	
85 90 95	
tat gtg aca att act ctg gat tta cag cag gtg ttc cag att gcc tac	456
Tyr Val Thr Ile Thr Leu Asp Leu Gln Gln Val Phe Gln Ile Ala Tyr	
100 105 110	
gta att gtg aag gca gcc aat tcc cct cgg cct gga aac tgg att ttg	504
Val Ile Val Lys Ala Ala Asn Ser Pro Arg Pro Gly Asn Trp Ile Leu	
115 120 125	
gaa cgt tcc ctg gat gac gtg gag tac aaa ccc tgg cag tat cat gcg	552
Glu Arg Ser Leu Asp Asp Val Glu Tyr Lys Pro Trp Gln Tyr His Ala	
130 135 140	
gtg aca gac acg gag tgc ctg acc ctc tac aat atc tat ccc cgc act	600
Val Thr Asp Thr Glu Cys Leu Thr Leu Tyr Asn Ile Tyr Pro Arg Thr	
145 150 155 160	
gga cca cca tcc tac gcc aaa gat gat gag gtc atc tgc act tca ttt	648
Gly Pro Pro Ser Tyr Ala Lys Asp Asp Glu Val Ile Cys Thr Ser Phe	
165 170 175	
tat tcg aag atc cac cct tta gaa aat gga gag att cac att tct ttg	696
Tyr Ser Lys Ile His Pro Leu Glu Asn Gly Glu Ile His Ile Ser Leu	
180 185 190	

atc aat ggg aga cca agt gct gat gac ccc tcc cct gaa ctc ctg gaa 744  
Ile Asn Gly Arg Pro Ser Ala Asp Asp Pro Ser Pro Glu Leu Leu Glu  
195 200 205

ttc acc tct gct cgc tac att cgc ctg aga ttt cag agg atc cgc acc 792  
Phe Thr Ser Ala Arg Tyr Ile Arg Leu Arg Phe Gln Arg Ile Arg Thr  
210 215 220

ttg aat gca gac ttg atg atg ttt gct cac aaa gac ccc aga gaa atc 840  
Leu Asn Ala Asp Leu Met Met Phe Ala His Lys Asp Pro Arg Glu Ile  
225 230 235 240

gat ccc att gtc aca cga aga tat tac tat tct gtc aag gat att tca 888  
Asp Pro Ile Val Thr Arg Arg Tyr Tyr Tyr Ser Val Lys Asp Ile Ser  
245 250 255

gtt ggc ggg atg tgc atc tgt tat ggt cat gcc cgg gct tgt cca ctt 936  
Val Gly Gly Met Cys Ile Cys Tyr Gly His Ala Arg Ala Cys Pro Leu  
260 265 270

gac cct gca aca aat aaa tca cgc tgt gag tgt gaa cat aac acc tgt 984  
Asp Pro Ala Thr Asn Lys Ser Arg Cys Glu Cys Glu His Asn Thr Cys  
275 280 285

ggg gaa agc tgt gac agg tgc tgt cca gga ttc cat cag aag cct tgg 1032  
Gly Glu Ser Cys Asp Arg Cys Cys Pro Gly Phe His Gln Lys Pro Trp  
290 295 300

aga gct gga acc ttc ctc acc aag tct gag tgt gaa gca tgc aat tgt 1080



Arg Ala Gly Thr Phe Leu Thr Lys Ser Glu Cys Glu Ala Cys Asn Cys  
305 310 315 320

cac gga aaa gct gag gaa tgc tat tat gat gaa act gtt gct agc aga 1128  
His Gly Lys Ala Glu Glu Cys Tyr Tyr Asp Glu Thr Val Ala Ser Arg  
325 330 335

aat cta agt tta aat ata cat ggg aag tac atc gga ggg ggt gtg tgc 1176  
Asn Leu Ser Leu Asn Ile His Gly Lys Tyr Ile Gly Gly Gly Val Cys  
340 345 350

atc aac tgc aca cat aac acg gct ggg ata aat tgt gag aca tgt gtt 1224  
Ile Asn Cys Thr His Asn Thr Ala Gly Ile Asn Cys Glu Thr Cys Val  
355 360 365

gat gga ttc ttc aga ccc aaa ggg gtg tca cca aat tat cca aga cca 1272  
Asp Gly Phe Phe Arg Pro Lys Gly Val Ser Pro Asn Tyr Pro Arg Pro  
370 375 380

tgc cag cca tgt cac tgt gat cca act ggc tcc ctt agt gaa gtc tgt 1320  
Cys Gln Pro Cys His Cys Asp Pro Thr Gly Ser Leu Ser Glu Val Cys  
385 390 395 400

gtc aaa gat gag aaa tac gcc cag cga ggg ttg aaa cct gga tcc tgt 1368  
Val Lys Asp Glu Lys Tyr Ala Gln Arg Gly Leu Lys Pro Gly Ser Cys  
405 410 415

cac tgc aaa act ggc ttt gga ggc gtg aac tgt gat cgc tgt gtc agg 1416  
His Cys Lys Thr Gly Phe Gly Gly Val Asn Cys Asp Arg Cys Val Arg

420	425	430	
ggt tac cat ggt tac cca gac tgc caa ccc tgt aac tgt agt ggc ttg			1464
Gly Tyr His Gly Tyr Pro Asp Cys Gln Pro Cys Asn Cys Ser Gly Leu			
435	440	445	
ggg agc aca aat gag gac cct tgc gtt ggg ccc tgt agc tgt aag gag			1512
Gly Ser Thr Asn Glu Asp Pro Cys Val Gly Pro Cys Ser Cys Lys Glu			
450	455	460	
aat gtt gaa ggt gaa gac tgt agt cgt tgc aaa tct ggt ttc ttc aac			1560
Asn Val Glu Gly Glu Asp Cys Ser Arg Cys Lys Ser Gly Phe Phe Asn			
465	470	475	480
ttg caa gaa gat aat cag aaa ggc tgt gag gag tgt ttc tgt tca gga			1608
Leu Gln Glu Asp Asn Gln Lys Gly Cys Glu Glu Cys Phe Cys Ser Gly			
485	490	495	
gta tca aac aga tgt cag agt tcc tac tgg acc tat ggg aat att caa			1656
Val Ser Asn Arg Cys Gln Ser Ser Tyr Trp Thr Tyr Gly Asn Ile Gln			
500	505	510	
gac atg cgt ggt tgg tat ctc aca gac ctc tct ggc cgc att cgg atg			1704
Asp Met Arg Gly Trp Tyr Leu Thr Asp Leu Ser Gly Arg Ile Arg Met			
515	520	525	
gct ccc cag ctt gat aac cct gac tca cct cag cag atc agc atc agt			1752
Ala Pro Gln Leu Asp Asn Pro Asp Ser Pro Gln Gln Ile Ser Ile Ser			
530	535	540	

aac tct gag gcc cgg aaa tcc ctg ctt gat ggt tac tac tgg agt gca	1800
Asn Ser Glu Ala Arg Lys Ser Leu Leu Asp Gly Tyr Tyr Trp Ser Ala	
545                      550                      555                      560	
ccg cct cca tat ctg gga aac aga ctt cca gct gtt ggg gga cag ttg	1848
Pro Pro Pro Tyr Leu Gly Asn Arg Leu Pro Ala Val Gly Gly Gln Leu	
565                      570                      575	
tca ttt acc atc tca tat gac ctc gaa gaa gag gaa gac gat aca gaa	1896
Ser Phe Thr Ile Ser Tyr Asp Leu Glu Glu Glu Glu Asp Asp Thr Glu	
580                      585                      590	
aaa ctc ctt cag ctg atg att atc ttt gag gga aat gac tta aga atc	1944
Lys Leu Leu Gln Leu Met Ile Ile Phe Glu Gly Asn Asp Leu Arg Ile	
595                      600                      605	
agc aca gcg tat aag gag gtg tac tta gag cca tct gaa gaa cac gtt	1992
Ser Thr Ala Tyr Lys Glu Val Tyr Leu Glu Pro Ser Glu Glu His Val	
610                      615                      620	
gag gag gtg tca ctc aaa gaa gag gcc ttt act ata cat gga aca aat	2040
Glu Glu Val Ser Leu Lys Glu Glu Ala Phe Thr Ile His Gly Thr Asn	
625                      630                      635                      640	
ttg cca gtc act aga aaa gat ttc atg att gtt ctc aca aat ttg gga	2088
Leu Pro Val Thr Arg Lys Asp Phe Met Ile Val Leu Thr Asn Leu Gly	
645                      650                      655	

gag atc ctt atc caa atc aca tac aac tta ggg atg gac gcc atc ttc 2136  
Glu Ile Leu Ile Gln Ile Thr Tyr Asn Leu Gly Met Asp Ala Ile Phe  
660 665 670

agg ctg agt tct gtc aat ctt gaa tct cct gtc cct tat cct act gat 2184  
Arg Leu Ser Ser Val Asn Leu Glu Ser Pro Val Pro Tyr Pro Thr Asp  
675 680 685

aga cgt att gca act gat gtg gaa gtt tgc cag tgt cca cct ggg tac 2232  
Arg Arg Ile Ala Thr Asp Val Glu Val Cys Gln Cys Pro Pro Gly Tyr  
690 695 700

agt ggc agc tct tgt gaa aca tgt tgg cct agg cac cga aga gtt aac 2280  
Ser Gly Ser Ser Cys Glu Thr Cys Trp Pro Arg His Arg Arg Val Asn  
705 710 715 720

ggc acc att ttt ggt ggc att tgt gaa cca tgt cag tgc ttt gct cat 2328  
Gly Thr Ile Phe Gly Gly Ile Cys Glu Pro Cys Gln Cys Phe Ala His  
725 730 735

gca gaa gcc tgt gat gac atc aca gga gaa tgt ctg aac tgt aag gat 2376  
Ala Glu Ala Cys Asp Asp Ile Thr Gly Glu Cys Leu Asn Cys Lys Asp  
740 745 750

cac aca ggt ggg ccg tac tgc aat gaa tgt ctc cct gga ttc tat ggt 2424  
His Thr Gly Gly Pro Tyr Cys Asn Glu Cys Leu Pro Gly Phe Tyr Gly  
755 760 765

gat cct act cga gga agc cct gaa gac tgt cag ccc tgt gcc tgt cca 2472

Asp Pro Thr Arg Gly Ser Pro Glu Asp Cys Gln Pro Cys Ala Cys Pro  
 770 775 780

ctc aat atc cca tca aat aac ttt agt cca aca tgc cat tta gac cgg 2520  
 Leu Asn Ile Pro Ser Asn Asn Phe Ser Pro Thr Cys His Leu Asp Arg  
 785 790 795 800

agt ctg gga ttg atc tgt gac gag tgt cct att ggg tac aca gga ccg 2568  
 Ser Leu Gly Leu Ile Cys Asp Glu Cys Pro Ile Gly Tyr Thr Gly Pro  
 805 810 815

cgc tgt gag agg tgt gca gaa ggc tat ttt gga caa cct tcc gta cct 2616  
 Arg Cys Glu Arg Cys Ala Glu Gly Tyr Phe Gly Gln Pro Ser Val Pro  
 820 825 830

gga gga tca tgt cag cca tgc caa tgc aat gac aac ctt gac tac tcc 2664  
 Gly Gly Ser Cys Gln Pro Cys Gln Cys Asn Asp Asn Leu Asp Tyr Ser  
 835 840 845

atc cct ggc agc tgt gac agc ctg tct ggc tcc tgt ctg att tgt aag 2712  
 Ile Pro Gly Ser Cys Asp Ser Leu Ser Gly Ser Cys Leu Ile Cys Lys  
 850 855 860

cca ggt aca aca ggc cgg tac tgt gag ctc tgt gct gat ggg tat ttt 2760  
 Pro Gly Thr Thr Gly Arg Tyr Cys Glu Leu Cys Ala Asp Gly Tyr Phe  
 865 870 875 880

gga gac gcg gtt aat aca aag aac tgt caa cca tgc cgt tgt gat atc 2808  
 Gly Asp Ala Val Asn Thr Lys Asn Cys Gln Pro Cys Arg Cys Asp Ile

885	890	895	
aat ggc tcc ttc tca gag gat tgt cac aca aga act ggg caa tgt gag			2856
Asn Gly Ser Phe Ser Glu Asp Cys His Thr Arg Thr Gly Gln Cys Glu			
900	905	910	
tgc aga ccc aat gtt cag ggg cgg cac tgt gac gag tgt aag cct gaa			2904
Cys Arg Pro Asn Val Gln Gly Arg His Cys Asp Glu Cys Lys Pro Glu			
915	920	925	
acc ttt ggc ctg caa ctg gga agg ggt tgt ctg ccc tgc aac tgc aat			2952
Thr Phe Gly Leu Gln Leu Gly Arg Gly Cys Leu Pro Cys Asn Cys Asn			
930	935	940	
tct ttt ggg tct aag tcc ttt gac tgt gaa gca agt ggg cag tgc tgg			3000
Ser Phe Gly Ser Lys Ser Phe Asp Cys Glu Ala Ser Gly Gln Cys Trp			
945	950	955	960
tgc cag cct gga gta gca ggg aag aaa tgt gac cgt tgt gcc cat ggc			3048
Cys Gln Pro Gly Val Ala Gly Lys Lys Cys Asp Arg Cys Ala His Gly			
965	970	975	
tac ttc aac ttc caa gaa gga ggc tgc ata gct tgt gac tgt tct cat			3096
Tyr Phe Asn Phe Gln Glu Gly Gly Cys Ile Ala Cys Asp Cys Ser His			
980	985	990	
ctg ggc aac aac tgt gac cca aaa act ggc caa tgc att tgc cca ccc			3144
Leu Gly Asn Asn Cys Asp Pro Lys Thr Gly Gln Cys Ile Cys Pro Pro			
995	1000	1005	

aat acc act gga gaa aag tgt tct gag tgt ctt ccc aac acc tgg	3189
Asn Thr Thr Gly Glu Lys Cys Ser Glu Cys Leu Pro Asn Thr Trp	
1010 1015 1020	
ggt cac agc att gtc acc ggc tgt aag gtt tgt aac tgc agc act	3234
Gly His Ser Ile Val Thr Gly Cys Lys Val Cys Asn Cys Ser Thr	
1025 1030 1035	
gtg ggg tcc ttg gct tct cag tgc aat gta aac acg ggc cag tgc	3279
Val Gly Ser Leu Ala Ser Gln Cys Asn Val Asn Thr Gly Gln Cys	
1040 1045 1050	
agc tgt cat cca aaa ttc tct ggt atg aaa tgc tca gag tgc agc	3324
Ser Cys His Pro Lys Phe Ser Gly Met Lys Cys Ser Glu Cys Ser	
1055 1060 1065	
cga ggt cac tgg aac tat cct ctc tgc act cta tgt gac tgc ttc	3369
Arg Gly His Trp Asn Tyr Pro Leu Cys Thr Leu Cys Asp Cys Phe	
1070 1075 1080	
ctt cca ggc aca gat gcc acg act tgt gat ctg gag act agg aaa	3414
Leu Pro Gly Thr Asp Ala Thr Thr Cys Asp Leu Glu Thr Arg Lys	
1085 1090 1095	
tgc tcc tgt agt gat caa act gga cag tgc agc tgt aag gtg aat	3459
Cys Ser Cys Ser Asp Gln Thr Gly Gln Cys Ser Cys Lys Val Asn	
1100 1105 1110	

gtg gaa ggc gtc cac tgt gac agg tgc cgg cct ggc aaa ttt gga	3504
Val Glu Gly Val His Cys Asp Arg Cys Arg Pro Gly Lys Phe Gly	
1115 1120 1125	
cta gat gcc aag aac cca ctt ggc tgc agc agc tgc tac tgc ttt	3549
Leu Asp Ala Lys Asn Pro Leu Gly Cys Ser Ser Cys Tyr Cys Phe	
1130 1135 1140	
gga gtt act agt caa tgc tct gaa gca aag ggg ctg atc cgt acg	3594
Gly Val Thr Ser Gln Cys Ser Glu Ala Lys Gly Leu Ile Arg Thr	
1145 1150 1155	
tgg gtg act ttg agt gat gaa cag acc att cta cct ctg gtg gat	3639
Trp Val Thr Leu Ser Asp Glu Gln Thr Ile Leu Pro Leu Val Asp	
1160 1165 1170	
gag gcc ctg cag cac acg act acc aaa ggc att gct ttc cag aaa	3684
Glu Ala Leu Gln His Thr Thr Thr Lys Gly Ile Ala Phe Gln Lys	
1175 1180 1185	
cca gag att gtt gca aag atg gat gaa gtc agg caa gag ctc cat	3729
Pro Glu Ile Val Ala Lys Met Asp Glu Val Arg Gln Glu Leu His	
1190 1195 1200	
ttg gaa cct ttt tac tgg aaa ctc cca caa caa ttt gaa ggg aaa	3774
Leu Glu Pro Phe Tyr Trp Lys Leu Pro Gln Gln Phe Glu Gly Lys	
1205 1210 1215	
aag ttg atg gct tat ggt ggc aaa ctc aag tat gcc atc tat ttt	3819



Lys Leu Met Ala Tyr Gly Gly Lys Leu Lys Tyr Ala Ile Tyr Phe  
 1220 1225 1230

gag gct cgg gat gag aca ggc ttt gcc aca tat aaa cct caa gtt 3864  
 Glu Ala Arg Asp Glu Thr Gly Phe Ala Thr Tyr Lys Pro Gln Val  
 1235 1240 1245

atc att cga ggt gga act cct act cat gct aga att att acc aga 3909  
 Ile Ile Arg Gly Gly Thr Pro Thr His Ala Arg Ile Ile Thr Arg  
 1250 1255 1260

cac atg gct gcc cct ctc att ggc cag ttg aca cgg cat gaa ata 3954  
 His Met Ala Ala Pro Leu Ile Gly Gln Leu Thr Arg His Glu Ile  
 1265 1270 1275

gaa atg aca gag aaa gaa tgg aaa tat tat ggt gat gat cct cga 3999  
 Glu Met Thr Glu Lys Glu Trp Lys Tyr Tyr Gly Asp Asp Pro Arg  
 1280 1285 1290

atc agt aga act gtg acc cgt gaa gac ttc ttg gat ata cta tat 4044  
 Ile Ser Arg Thr Val Thr Arg Glu Asp Phe Leu Asp Ile Leu Tyr  
 1295 1300 1305

gat att cac tat atc ctt atc aag gct act tat gga aac gtt gtg 4089  
 Asp Ile His Tyr Ile Leu Ile Lys Ala Thr Tyr Gly Asn Val Val  
 1310 1315 1320

aga caa agc cgc att tct gaa atc tcc atg gaa gta gct gaa cca 4134  
 Arg Gln Ser Arg Ile Ser Glu Ile Ser Met Glu Val Ala Glu Pro

1325	1330	1335	
gga cat gta tta gca ggg agc cca cca gca cac ttg ata gaa aga			4179
Gly His Val Leu Ala Gly Ser Pro Pro Ala His Leu Ile Glu Arg			
1340	1345	1350	
tgc gat tgc cct cct ggc tat tct ggc ttg tct tgt gag acg tgt			4224
Cys Asp Cys Pro Pro Gly Tyr Ser Gly Leu Ser Cys Glu Thr Cys			
1355	1360	1365	
gca cca gga ttt tac cga ctt cgt tct gaa cca ggt ggg cgg act			4269
Ala Pro Gly Phe Tyr Arg Leu Arg Ser Glu Pro Gly Gly Arg Thr			
1370	1375	1380	
cct gga cca acc tta ggg acc tgt gtt ccc tgc caa tgt aat gga			4314
Pro Gly Pro Thr Leu Gly Thr Cys Val Pro Cys Gln Cys Asn Gly			
1385	1390	1395	
cac agc agt cag tgt gat cct gag acc tca gta tgc cag aat tgt			4359
His Ser Ser Gln Cys Asp Pro Glu Thr Ser Val Cys Gln Asn Cys			
1400	1405	1410	
cag cat cac act gct ggt gac ttc tgt gag cgc tgt gcc ctt ggc			4404
Gln His His Thr Ala Gly Asp Phe Cys Glu Arg Cys Ala Leu Gly			
1415	1420	1425	
tac tat gga atc gtc agg gga ttg cca aat gac tgc caa cca tgt			4449
Tyr Tyr Gly Ile Val Arg Gly Leu Pro Asn Asp Cys Gln Pro Cys			
1430	1435	1440	

gct tgt cct ctg att tcg ccc agc aac aat ttc agc ccc tct tgt 4494  
Ala Cys Pro Leu Ile Ser Pro Ser Asn Asn Phe Ser Pro Ser Cys  
1445 1450 1455

gta ttg gaa ggt ctg gaa gat tac cgt tgc acc gcc tgc cca agg 4539  
Val Leu Glu Gly Leu Glu Asp Tyr Arg Cys Thr Ala Cys Pro Arg  
1460 1465 1470

ggc tat gaa gga cag tac tgt gaa agg tgt gcc cca ggc tat act 4584  
Gly Tyr Glu Gly Gln Tyr Cys Glu Arg Cys Ala Pro Gly Tyr Thr  
1475 1480 1485

ggc agc cca agc agc ccc gga ggc tcc tgc caa gaa tgt gag tgt 4629  
Gly Ser Pro Ser Ser Pro Gly Gly Ser Cys Gln Glu Cys Glu Cys  
1490 1495 1500

gac cct tat ggc tcc cta ccg gtt ccc tgt gac cgg gtc aca gga 4674  
Asp Pro Tyr Gly Ser Leu Pro Val Pro Cys Asp Arg Val Thr Gly  
1505 1510 1515

ctc tgc acg tgc cgc cct gga gcc aca gga agg aag tgt gat ggc 4719  
Leu Cys Thr Cys Arg Pro Gly Ala Thr Gly Arg Lys Cys Asp Gly  
1520 1525 1530

tgc gag cac tgg cat gca cgc gag ggt gca gag tgt gtc ttt tgt 4764  
Cys Glu His Trp His Ala Arg Glu Gly Ala Glu Cys Val Phe Cys  
1535 1540 1545

gga gac	gag tgt aca ggc ctt	ctt ctt ggt gac ctg	gct cgt cta	4809
Gly Asp	Glu Cys Thr Gly Leu	Leu Leu Gly Asp Leu	Ala Arg Leu	
1550	1555	1560		
gag cag	atg acc atg aac atc	aac ctc acg ggc cca	ctg cct gct	4854
Glu Gln	Met Thr Met Asn Ile	Asn Leu Thr Gly Pro	Leu Pro Ala	
1565	1570	1575		
cca tat	aaa att ctg tat ggt	ctt gaa aat aca act	cag gaa ctc	4899
Pro Tyr	Lys Ile Leu Tyr Gly	Leu Glu Asn Thr Thr	Gln Glu Leu	
1580	1585	1590		
aag cac	ctg cta tca ccg caa	cgg gca cca gag agg	ctc att cag	4944
Lys His	Leu Leu Ser Pro Gln	Arg Ala Pro Glu Arg	Leu Ile Gln	
1595	1600	1605		
ttg gca	gag ggc aac gtg aac	aca ctt gtg atg gaa	aca aat gag	4989
Leu Ala	Glu Gly Asn Val Asn	Thr Leu Val Met Glu	Thr Asn Glu	
1610	1615	1620		
ctg cta	acc aga gca acc aaa	gtg aca gca gat ggt	gag caa aca	5034
Leu Leu	Thr Arg Ala Thr Lys	Val Thr Ala Asp Gly	Glu Gln Thr	
1625	1630	1635		
gga caa	gat gct gag agg acc	aac tcc aga gca gaa	tcc ttg gaa	5079
Gly Gln	Asp Ala Glu Arg Thr	Asn Ser Arg Ala Glu	Ser Leu Glu	
1640	1645	1650		
gaa ttc	att aaa ggg ctt gtc	cag gat gct gaa gcc	ata aat gaa	5124

Glu Phe Ile Lys Gly Leu Val Gln Asp Ala Glu Ala Ile Asn Glu  
 1655 1660 1665

aaa gct gta aaa cta aat gaa acc tta gga aat caa gat aag aca 5169  
 Lys Ala Val Lys Leu Asn Glu Thr Leu Gly Asn Gln Asp Lys Thr  
 1670 1675 1680

gca gag aga aac ttg gag gag ctt caa aag gaa atc gac cgg atg 5214  
 Ala Glu Arg Asn Leu Glu Glu Leu Gln Lys Glu Ile Asp Arg Met  
 1685 1690 1695

ctg aag gaa ctg aga agt aaa gat ctt caa aca cag aag gaa gtt 5259  
 Leu Lys Glu Leu Arg Ser Lys Asp Leu Gln Thr Gln Lys Glu Val  
 1700 1705 1710

gct gag gat gag ctc gtg gca gca gaa ggc ctt ctg aag aga gta 5304  
 Ala Glu Asp Glu Leu Val Ala Ala Glu Gly Leu Leu Lys Arg Val  
 1715 1720 1725

aac aag ctg ttt gga gag ccc aga gcc cag aat gaa gat atg gaa 5349  
 Asn Lys Leu Phe Gly Glu Pro Arg Ala Gln Asn Glu Asp Met Glu  
 1730 1735 1740

aag gat ctc cag cag aaa ctg gca gag tac aag aac aaa ctt gat 5394  
 Lys Asp Leu Gln Gln Lys Leu Ala Glu Tyr Lys Asn Lys Leu Asp  
 1745 1750 1755

gat gct tgg gat cta ttg aga gaa gcc act gat aaa acc cga gat 5439  
 Asp Ala Trp Asp Leu Leu Arg Glu Ala Thr Asp Lys Thr Arg Asp

1760	1765	1770	
gct aat cgt ttg tct gct gcc aat caa aaa aac atg acc ata ctg			5484
Ala Asn Arg Leu Ser Ala Ala Asn Gln Lys Asn Met Thr Ile Leu			
1775	1780	1785	
gag aca aag aag gag gct att gaa ggt agc aaa cga caa ata gag			5529
Glu Thr Lys Lys Glu Ala Ile Glu Gly Ser Lys Arg Gln Ile Glu			
1790	1795	1800	
aac act tta aag gaa ggc aat gac atc ctt gat gaa gcc aat caa			5574
Asn Thr Leu Lys Glu Gly Asn Asp Ile Leu Asp Glu Ala Asn Gln			
1805	1810	1815	
ctc tta ggt gaa atc aac tca gtc ata gat tat gtc gac gac att			5619
Leu Leu Gly Glu Ile Asn Ser Val Ile Asp Tyr Val Asp Asp Ile			
1820	1825	1830	
aaa act aag ttg cca cca atg tcc gag gag ctg agt gac aaa ata			5664
Lys Thr Lys Leu Pro Pro Met Ser Glu Glu Leu Ser Asp Lys Ile			
1835	1840	1845	
gat gac ctc gcc cag gaa ata aag gac aga agg ctt gct gag aag			5709
Asp Asp Leu Ala Gln Glu Ile Lys Asp Arg Arg Leu Ala Glu Lys			
1850	1855	1860	
gtg ttc cag gct gag agc cat gct gct cag ctg aac gac tcg tct			5754
Val Phe Gln Ala Glu Ser His Ala Ala Gln Leu Asn Asp Ser Ser			
1865	1870	1875	

gct gta ctt gat gga atc ctg gat gag gct aag aac atc tct ttc	5799
Ala Val Leu Asp Gly Ile Leu Asp Glu Ala Lys Asn Ile Ser Phe	
1880 1885 1890	
aat gcc acg gca gcc ttc aga gct tac agt aat att aaa gac tac	5844
Asn Ala Thr Ala Ala Phe Arg Ala Tyr Ser Asn Ile Lys Asp Tyr	
1895 1900 1905	
att gat gaa gct gag aaa gtg gcc aga gaa gcc aaa gag ctt gcc	5889
Ile Asp Glu Ala Glu Lys Val Ala Arg Glu Ala Lys Glu Leu Ala	
1910 1915 1920	
caa ggg gct aca aaa ctg gca aca agt cct cag ggc tta tta aaa	5934
Gln Gly Ala Thr Lys Leu Ala Thr Ser Pro Gln Gly Leu Leu Lys	
1925 1930 1935	
gaa gat gcc aaa ggc tcc ctt cag aaa agc ttc agg atc ctc aat	5979
Glu Asp Ala Lys Gly Ser Leu Gln Lys Ser Phe Arg Ile Leu Asn	
1940 1945 1950	
gaa gcc aag aag cta gca aac gat gtg aaa gga aat cac aat gat	6024
Glu Ala Lys Lys Leu Ala Asn Asp Val Lys Gly Asn His Asn Asp	
1955 1960 1965	
cta aat gac ctg aaa acc agg tta gaa act gct gac ctt aga aac	6069
Leu Asn Asp Leu Lys Thr Arg Leu Glu Thr Ala Asp Leu Arg Asn	
1970 1975 1980	

agt gga ctt cta gga gct cta aat gac acc atg gac aag tta tca	6114
Ser Gly Leu Leu Gly Ala Leu Asn Asp Thr Met Asp Lys Leu Ser	
1985 1990 1995	
gcc att aca aat gac acg gct gct aaa ctg cag gct gtc aaa gag	6159
Ala Ile Thr Asn Asp Thr Ala Ala Lys Leu Gln Ala Val Lys Glu	
2000 2005 2010	
aaa gcc aga gaa gcc aat gac aca gca aaa gct gtc ctg gcc cag	6204
Lys Ala Arg Glu Ala Asn Asp Thr Ala Lys Ala Val Leu Ala Gln	
2015 2020 2025	
gtt aag gac ctg cat cag aac cta gat ggc ctg aag caa aac tac	6249
Val Lys Asp Leu His Gln Asn Leu Asp Gly Leu Lys Gln Asn Tyr	
2030 2035 2040	
aat aaa ctg gca gac agc gtg gcc aaa acg aac gct gtg gtg aaa	6294
Asn Lys Leu Ala Asp Ser Val Ala Lys Thr Asn Ala Val Val Lys	
2045 2050 2055	
gat cct tcc aaa aac aaa atc att gca gat gca ggc act tcc gtg	6339
Asp Pro Ser Lys Asn Lys Ile Ile Ala Asp Ala Gly Thr Ser Val	
2060 2065 2070	
aga aat cta gaa cag gaa gct gac cgg cta atc gac aaa ctc aag	6384
Arg Asn Leu Glu Gln Glu Ala Asp Arg Leu Ile Asp Lys Leu Lys	
2075 2080 2085	
ccc atc aag gag ctt gag gac aac cta aag aaa aac att tct gaa	6429



Pro Ile	Lys Glu Leu Glu Asp	Asn Leu Lys Lys Asn	Ile Ser Glu	
2090	2095	2100		
ata aag gaa ctg atc aac caa gct cgg aaa caa gct aac tct atc				6474
Ile Lys	Glu Leu Ile Asn Gln	Ala Arg Lys Gln Ala	Asn Ser Ile	
2105	2110	2115		
aaa gta tct gtt tct tcg gga ggt gac tgt gtt cgg aca tac agg				6519
Lys Val	Ser Val Ser Ser Gly	Gly Asp Cys Val Arg	Thr Tyr Arg	
2120	2125	2130		
cca gaa atc aag aaa gga agc tac aat aac atc gtt gtc cat gtc				6564
Pro Glu	Ile Lys Lys Gly Ser	Tyr Asn Asn Ile Val	Val His Val	
2135	2140	2145		
aag acc gct gtt gcc gac aac ctc ctt ttt tat ctt gga agt gcc				6609
Lys Thr	Ala Val Ala Asp Asn	Leu Leu Phe Tyr Leu	Gly Ser Ala	
2150	2155	2160		
aaa ttt att gac ttt ctt gct ata gaa atg cgc aaa ggc aaa gtc				6654
Lys Phe	Ile Asp Phe Leu Ala	Ile Glu Met Arg Lys	Gly Lys Val	
2165	2170	2175		
agc ttc ctc tgg att gtt ggc tct gga gtt ggc cga gta ggg ttt				6699
Ser Phe	Leu Trp Ile Val Gly	Ser Gly Val Gly Arg	Val Gly Phe	
2180	2185	2190		
cca gac ttg acc atc gac gac tcc tat tgg tac cgt att gaa gca				6744
Pro Asp	Leu Thr Ile Asp Asp	Ser Tyr Trp Tyr Arg	Ile Glu Ala	

2195	2200	2205	
tca aga acg gga aga aat gga tct att tct gtg aga gct tta gat			6789
Ser Arg Thr Gly Arg Asn Gly Ser Ile Ser Val Arg Ala Leu Asp			
2210	2215	2220	
gga ccc aaa gcc agt atg gta ccc agc acc tac cat tca gtg tct			6834
Gly Pro Lys Ala Ser Met Val Pro Ser Thr Tyr His Ser Val Ser			
2225	2230	2235	
cct ccc ggg tat act atc cta gat gtg gat gca aat gca atg ctg			6879
Pro Pro Gly Tyr Thr Ile Leu Asp Val Asp Ala Asn Ala Met Leu			
2240	2245	2250	
ttt gtt ggt ggc ctg acc gga aaa ata aag aag gcc gat gct gta			6924
Phe Val Gly Gly Leu Thr Gly Lys Ile Lys Lys Ala Asp Ala Val			
2255	2260	2265	
cgt gtg atc acc ttc acc ggc tgt atg gga gaa aca tac ttt gac			6969
Arg Val Ile Thr Phe Thr Gly Cys Met Gly Glu Thr Tyr Phe Asp			
2270	2275	2280	
aac aaa cct ata ggt tta tgg aac ttc cgg gag aaa gaa ggc gac			7014
Asn Lys Pro Ile Gly Leu Trp Asn Phe Arg Glu Lys Glu Gly Asp			
2285	2290	2295	
tgt aag gga tgt act gtc agc cca caa gtg gaa gat agt gag ggg			7059
Cys Lys Gly Cys Thr Val Ser Pro Gln Val Glu Asp Ser Glu Gly			
2300	2305	2310	

act att cag ttt gat ggt gaa ggc tat gca tta gtg agc cgg ccc 7104  
Thr Ile Gln Phe Asp Gly Glu Gly Tyr Ala Leu Val Ser Arg Pro  
2315 2320 2325

atc cgc tgg tac ccc aac atc tcc aca gtc atg ttc aag ttc cgg 7149  
Ile Arg Trp Tyr Pro Asn Ile Ser Thr Val Met Phe Lys Phe Arg  
2330 2335 2340

aca ttt tca tca agt gct ctc ctg atg tat ctt gcc aca cga gac 7194  
Thr Phe Ser Ser Ser Ala Leu Leu Met Tyr Leu Ala Thr Arg Asp  
2345 2350 2355

ctg aaa gat ttc atg agt gta gag ctc agt gat gga cat gtg aaa 7239  
Leu Lys Asp Phe Met Ser Val Glu Leu Ser Asp Gly His Val Lys  
2360 2365 2370

gtc agc tat gac ctg ggc tca gga atg act tcc gtt gtc agc aat 7284  
Val Ser Tyr Asp Leu Gly Ser Gly Met Thr Ser Val Val Ser Asn  
2375 2380 2385

caa aac cat aat gat ggg aaa tgg aaa gca ttc acg ctg tcg cgg 7329  
Gln Asn His Asn Asp Gly Lys Trp Lys Ala Phe Thr Leu Ser Arg  
2390 2395 2400

att cag aaa caa gcc aac ata tcg att gtc gac atc gat tct aac 7374  
Ile Gln Lys Gln Ala Asn Ile Ser Ile Val Asp Ile Asp Ser Asn  
2405 2410 2415

cag gag gag aat gta gct act tca tct tct gga aac aac ttt ggt	7419
Gln Glu Glu Asn Val Ala Thr Ser Ser Ser Gly Asn Asn Phe Gly	
2420 2425 2430	
ctt gac ttg aaa gca gat gac aaa ata tat ttt ggt ggc ctg cca	7464
Leu Asp Leu Lys Ala Asp Asp Lys Ile Tyr Phe Gly Gly Leu Pro	
2435 2440 2445	
act ctg aga aac ttg agt atg aaa gca agg cca gaa gtc aat gtg	7509
Thr Leu Arg Asn Leu Ser Met Lys Ala Arg Pro Glu Val Asn Val	
2450 2455 2460	
aag aaa tac tcc ggc tgc ctc aaa gat att gaa att tca aga aca	7554
Lys Lys Tyr Ser Gly Cys Leu Lys Asp Ile Glu Ile Ser Arg Thr	
2465 2470 2475	
cct tac aat ata ctc agc agc cct gat tat gtt ggt gtg acc aaa	7599
Pro Tyr Asn Ile Leu Ser Ser Pro Asp Tyr Val Gly Val Thr Lys	
2480 2485 2490	
ggc tgt tca ctg gag aat gtt aat aca gtt agt ttc ccc aag cct	7644
Gly Cys Ser Leu Glu Asn Val Asn Thr Val Ser Phe Pro Lys Pro	
2495 2500 2505	
ggc ttt gtg gag ctt gcc gct gtg tct att gat gtt gga aca gaa	7689
Gly Phe Val Glu Leu Ala Ala Val Ser Ile Asp Val Gly Thr Glu	
2510 2515 2520	
atc aat ctg tcc ttt agt acc agg aac gag tct ggg atc att ctc	7734

Ile Asn Leu Ser Phe Ser Thr Arg Asn Glu Ser Gly Ile Ile Leu  
2525 2530 2535

ttg gga agt gga ggg aca ctc aca cca ccc agg aga aaa cgg aga 7779  
Leu Gly Ser Gly Gly Thr Leu Thr Pro Pro Arg Arg Lys Arg Arg  
2540 2545 2550

caa acc aca cag gct tat tat gcc ata ttc ctc aac aag ggc cgc 7824  
Gln Thr Thr Gln Ala Tyr Tyr Ala Ile Phe Leu Asn Lys Gly Arg  
2555 2560 2565

ttg gaa gtg cat ctc tcc tcg ggg aca cgg aca atg agg aaa att 7869  
Leu Glu Val His Leu Ser Ser Gly Thr Arg Thr Met Arg Lys Ile  
2570 2575 2580

gtc atc aaa ccg gag cca aat ttg ttt cat gat ggg aga gaa cat 7914  
Val Ile Lys Pro Glu Pro Asn Leu Phe His Asp Gly Arg Glu His  
2585 2590 2595

tct gtc cac gta gaa aga acc aga ggc atc ttc act gtt caa att 7959  
Ser Val His Val Glu Arg Thr Arg Gly Ile Phe Thr Val Gln Ile  
2600 2605 2610

gat gaa gac aga aga cat atc caa aac ctg aca gag gaa cag ccc 8004  
Asp Glu Asp Arg Arg His Ile Gln Asn Leu Thr Glu Glu Gln Pro  
2615 2620 2625

atc gaa gtg aaa aag ctc ttt gtc ggg ggt gct cct cct gaa ttt 8049  
Ile Glu Val Lys Lys Leu Phe Val Gly Gly Ala Pro Pro Glu Phe

2630	2635	2640	
cag ccc tcc cca ctc agg aat att ccg gcc ttt caa ggc tgt gtg			8094
Gln Pro Ser Pro Leu Arg Asn Ile Pro Ala Phe Gln Gly Cys Val			
2645	2650	2655	
tggt aac ctt gtt att aac tcc atc ccc atg gac ttt gcg cag cct			8139
Trp Asn Leu Val Ile Asn Ser Ile Pro Met Asp Phe Ala Gln Pro			
2660	2665	2670	
ata gcc ttc aaa aat gcc gac att ggt cgc tgt acc tat caa aag			8184
Ile Ala Phe Lys Asn Ala Asp Ile Gly Arg Cys Thr Tyr Gln Lys			
2675	2680	2685	
ccc cgg gaa gat gag agt gaa gca gtt cca gct gaa gtt att gtc			8229
Pro Arg Glu Asp Glu Ser Glu Ala Val Pro Ala Glu Val Ile Val			
2690	2695	2700	
cag cct cag tcg gtg ccc acc cct gcc ttc cct ttc cca gtc ccc			8274
Gln Pro Gln Ser Val Pro Thr Pro Ala Phe Pro Phe Pro Val Pro			
2705	2710	2715	
acc atg gtg cat ggc cct tgt gtt gca gaa tca gaa cca gct ctt			8319
Thr Met Val His Gly Pro Cys Val Ala Glu Ser Glu Pro Ala Leu			
2720	2725	2730	
ctg aca ggg agc aag cag ttt ggg ctt tcc aga aac agc cac att			8364
Leu Thr Gly Ser Lys Gln Phe Gly Leu Ser Arg Asn Ser His Ile			
2735	2740	2745	

gca att gtc ttt gat gac acc aaa gtt aaa aac cgc ctc acc att	8409
Ala Ile Val Phe Asp Asp Thr Lys Val Lys Asn Arg Leu Thr Ile	
2750 2755 2760	
gag ctg gag gta cga act gaa gct gaa tca ggc ttg ctc ttc tac	8454
Glu Leu Glu Val Arg Thr Glu Ala Glu Ser Gly Leu Leu Phe Tyr	
2765 2770 2775	
atg ggt cgg atc aat cat gct gat ttt ggt act gtt cag ctg agg	8499
Met Gly Arg Ile Asn His Ala Asp Phe Gly Thr Val Gln Leu Arg	
2780 2785 2790	
aat ggg ttc ccg ttc ttc agt tat gat ttg ggg agt ggg agc acc	8544
Asn Gly Phe Pro Phe Phe Ser Tyr Asp Leu Gly Ser Gly Ser Thr	
2795 2800 2805	
aga acc atg atc ccc aca aaa atc aac gat ggt cag tgg cac aag	8589
Arg Thr Met Ile Pro Thr Lys Ile Asn Asp Gly Gln Trp His Lys	
2810 2815 2820	
att aag att gtg aga gtg aag cag gag gga att ctt tat gtg gat	8634
Ile Lys Ile Val Arg Val Lys Gln Glu Gly Ile Leu Tyr Val Asp	
2825 2830 2835	
gat gcc tcc agc caa acc atc agt ccc aag aaa gcc gac atc ctg	8679
Asp Ala Ser Ser Gln Thr Ile Ser Pro Lys Lys Ala Asp Ile Leu	
2840 2845 2850	

gat gtc ggg ggg att ctg tat gtc ggt gga ttg ccg atc aac tat 8724  
 Asp Val Gly Gly Ile Leu Tyr Val Gly Gly Leu Pro Ile Asn Tyr  
 2855 2860 2865

acc aca cgc aga att ggt cca gtg act tac agc ctg gat ggc tgt 8769  
 Thr Thr Arg Arg Ile Gly Pro Val Thr Tyr Ser Leu Asp Gly Cys  
 2870 2875 2880

gtt agg aat ctt cac atg gaa caa gcc cct gtt gat ctg gac cag 8814  
 Val Arg Asn Leu His Met Glu Gln Ala Pro Val Asp Leu Asp Gln  
 2885 2890 2895

cct acc tcc agc ttt cac gtt ggg aca tgc ttt gcg aat gca gag 8859  
 Pro Thr Ser Ser Phe His Val Gly Thr Cys Phe Ala Asn Ala Glu  
 2900 2905 2910

agt ggg act tac ttt gat gga acc ggt ttt ggt aaa gca gtt ggt 8904  
 Ser Gly Thr Tyr Phe Asp Gly Thr Gly Phe Gly Lys Ala Val Gly  
 2915 2920 2925

ggg ttc atc gtt gga ttg gac ctt ctt gtg gaa ttt gaa ttc cgt 8949  
 Gly Phe Ile Val Gly Leu Asp Leu Leu Val Glu Phe Glu Phe Arg  
 2930 2935 2940

acc aca aga ccc act ggg gtc ctc ctg ggg atc agc agt cag aag 8994  
 Thr Thr Arg Pro Thr Gly Val Leu Leu Gly Ile Ser Ser Gln Lys



2945	2950	2955	
atg gat gga atg ggt att gaa	atg atc gac gag aag	ctt atg ttc	9039
Met Asp Gly Met Gly Ile Glu	Met Ile Asp Glu Lys	Leu Met Phe	
2960	2965	2970	
cac gtg gat aat ggc gct ggc	cga ttc act gca att	tat gat gct	9084
His Val Asp Asn Gly Ala Gly	Arg Phe Thr Ala Ile	Tyr Asp Ala	
2975	2980	2985	
gag atc cca ggc cac atg tgc	aat gga cag tgg tat	aaa gtc act	9129
Glu Ile Pro Gly His Met Cys	Asn Gly Gln Trp Tyr	Lys Val Thr	
2990	2995	3000	
gcc aag aag atc aaa aac cgt	ctt gag ctg gtg gta	gat ggg aac	9174
Ala Lys Lys Ile Lys Asn Arg	Leu Glu Leu Val Val	Asp Gly Asn	
3005	3010	3015	
cag gtg gat gcc cag agc cca	aac tca gca tcg aca	tca gct gat	9219
Gln Val Asp Ala Gln Ser Pro	Asn Ser Ala Ser Thr	Ser Ala Asp	
3020	3025	3030	
aca aac gac cct gtt ttc gtt	ggc ggt ttc cca ggt	ggc ctc aat	9264
Thr Asn Asp Pro Val Phe Val	Gly Gly Phe Pro Gly	Gly Leu Asn	
3035	3040	3045	
cag ttt ggc ctg acc acc aac	att agg ttc cga ggc	tgc atc cga	9309
Gln Phe Gly Leu Thr Thr Asn	Ile Arg Phe Arg Gly	Cys Ile Arg	
3050	3055	3060	

tct ctg aag ctc acc aaa ggc act gca aac cgc tgg agg tta att 9354  
Ser Leu Lys Leu Thr Lys Gly Thr Ala Asn Arg Trp Arg Leu Ile  
3065 3070 3075

ttg cca agg ccc tgg aac tgaggggtgt tcaacctgta tcatgcccga 9402  
Leu Pro Arg Pro Trp Asn  
3080

ctacctataa aagatagttc aatcctgagg agaattcatc aaaacaagta tatcaagtta 9462

aacaatatac actcctatca tattaataaa actaatgtgc agcggccgc 9511

<210> 6

<211> 3084

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Gln Arg Arg Gln Ser Gln Ala His Gln Gln Arg Gly Leu Phe Pro Ala  
1 5 10 15

Val Leu Asn Leu Ala Ser Asn Ala Leu Ile Thr Thr Asn Ala Thr Cys  
20 25 30

Gly Glu Lys Gly Pro Glu Met Tyr Cys Lys Leu Val Glu His Val Pro  
35 40 45

Gly Gln Pro Val Arg Asn Pro Gln Cys Arg Ile Cys Asn Gln Asn Ser  
50 55 60

Ser Asn Pro Tyr Gln Arg His Pro Ile Thr Asn Ala Ile Asp Gly Lys  
65 70 75 80

Asn Thr Trp Trp Gln Ser Pro Ser Ile Lys Asn Gly Val Glu Tyr His  
85 90 95

Tyr Val Thr Ile Thr Leu Asp Leu Gln Gln Val Phe Gln Ile Ala Tyr  
100 105 110

Val Ile Val Lys Ala Ala Asn Ser Pro Arg Pro Gly Asn Trp Ile Leu  
115 120 125

Glu Arg Ser Leu Asp Asp Val Glu Tyr Lys Pro Trp Gln Tyr His Ala  
130 135 140

Val Thr Asp Thr Glu Cys Leu Thr Leu Tyr Asn Ile Tyr Pro Arg Thr

145                      150                      155                      160

Gly Pro Pro Ser Tyr Ala Lys Asp Asp Glu Val Ile Cys Thr Ser Phe  
                                 165                      170                      175

Tyr Ser Lys Ile His Pro Leu Glu Asn Gly Glu Ile His Ile Ser Leu  
                                 180                      185                      190

Ile Asn Gly Arg Pro Ser Ala Asp Asp Pro Ser Pro Glu Leu Leu Glu  
                                 195                      200                      205

Phe Thr Ser Ala Arg Tyr Ile Arg Leu Arg Phe Gln Arg Ile Arg Thr  
                                 210                      215                      220

Leu Asn Ala Asp Leu Met Met Phe Ala His Lys Asp Pro Arg Glu Ile  
225                      230                      235                      240

Asp Pro Ile Val Thr Arg Arg Tyr Tyr Tyr Ser Val Lys Asp Ile Ser  
                                 245                      250                      255

Val Gly Gly Met Cys Ile Cys Tyr Gly His Ala Arg Ala Cys Pro Leu  
                                 260                      265                      270

Asp Pro Ala Thr Asn Lys Ser Arg Cys Glu Cys Glu His Asn Thr Cys

275

280

285

Gly Glu Ser Cys Asp Arg Cys Cys Pro Gly Phe His Gln Lys Pro Trp

290

295

300

Arg Ala Gly Thr Phe Leu Thr Lys Ser Glu Cys Glu Ala Cys Asn Cys

305

310

315

320

His Gly Lys Ala Glu Glu Cys Tyr Tyr Asp Glu Thr Val Ala Ser Arg

325

330

335

Asn Leu Ser Leu Asn Ile His Gly Lys Tyr Ile Gly Gly Gly Val Cys

340

345

350

Ile Asn Cys Thr His Asn Thr Ala Gly Ile Asn Cys Glu Thr Cys Val

355

360

365

Asp Gly Phe Phe Arg Pro Lys Gly Val Ser Pro Asn Tyr Pro Arg Pro

370

375

380

Cys Gln Pro Cys His Cys Asp Pro Thr Gly Ser Leu Ser Glu Val Cys  
385 390 395 400

Val Lys Asp Glu Lys Tyr Ala Gln Arg Gly Leu Lys Pro Gly Ser Cys  
405 410 415

His Cys Lys Thr Gly Phe Gly Gly Val Asn Cys Asp Arg Cys Val Arg  
420 425 430

Gly Tyr His Gly Tyr Pro Asp Cys Gln Pro Cys Asn Cys Ser Gly Leu  
435 440 445

Gly Ser Thr Asn Glu Asp Pro Cys Val Gly Pro Cys Ser Cys Lys Glu  
450 455 460

Asn Val Glu Gly Glu Asp Cys Ser Arg Cys Lys Ser Gly Phe Phe Asn  
465 470 475 480

Leu Gln Glu Asp Asn Gln Lys Gly Cys Glu Glu Cys Phe Cys Ser Gly  
485 490 495

Val Ser Asn Arg Cys Gln Ser Ser Tyr Trp Thr Tyr Gly Asn Ile Gln  
500 505 510

Asp Met Arg Gly Trp Tyr Leu Thr Asp Leu Ser Gly Arg Ile Arg Met  
515 520 525

Ala Pro Gln Leu Asp Asn Pro Asp Ser Pro Gln Gln Ile Ser Ile Ser  
530 535 540

Asn Ser Glu Ala Arg Lys Ser Leu Leu Asp Gly Tyr Tyr Trp Ser Ala  
545 550 555 560

Pro Pro Pro Tyr Leu Gly Asn Arg Leu Pro Ala Val Gly Gly Gln Leu  
565 570 575

Ser Phe Thr Ile Ser Tyr Asp Leu Glu Glu Glu Glu Asp Asp Thr Glu  
580 585 590

Lys Leu Leu Gln Leu Met Ile Ile Phe Glu Gly Asn Asp Leu Arg Ile  
595 600 605

Ser Thr Ala Tyr Lys Glu Val Tyr Leu Glu Pro Ser Glu Glu His Val

610

615

620

Glu Glu Val Ser Leu Lys Glu Glu Ala Phe Thr Ile His Gly Thr Asn

625

630

635

640

Leu Pro Val Thr Arg Lys Asp Phe Met Ile Val Leu Thr Asn Leu Gly

645

650

655

Glu Ile Leu Ile Gln Ile Thr Tyr Asn Leu Gly Met Asp Ala Ile Phe

660

665

670

Arg Leu Ser Ser Val Asn Leu Glu Ser Pro Val Pro Tyr Pro Thr Asp

675

680

685

Arg Arg Ile Ala Thr Asp Val Glu Val Cys Gln Cys Pro Pro Gly Tyr

690

695

700

Ser Gly Ser Ser Cys Glu Thr Cys Trp Pro Arg His Arg Arg Val Asn

705

710

715

720

Gly Thr Ile Phe Gly Gly Ile Cys Glu Pro Cys Gln Cys Phe Ala His

725

730

735



Ala Glu Ala Cys Asp Asp Ile Thr Gly Glu Cys Leu Asn Cys Lys Asp  
740 745 750

His Thr Gly Gly Pro Tyr Cys Asn Glu Cys Leu Pro Gly Phe Tyr Gly  
755 760 765

Asp Pro Thr Arg Gly Ser Pro Glu Asp Cys Gln Pro Cys Ala Cys Pro  
770 775 780

Leu Asn Ile Pro Ser Asn Asn Phe Ser Pro Thr Cys His Leu Asp Arg  
785 790 795 800

Ser Leu Gly Leu Ile Cys Asp Glu Cys Pro Ile Gly Tyr Thr Gly Pro  
805 810 815

Arg Cys Glu Arg Cys Ala Glu Gly Tyr Phe Gly Gln Pro Ser Val Pro  
820 825 830

Gly Gly Ser Cys Gln Pro Cys Gln Cys Asn Asp Asn Leu Asp Tyr Ser  
835 840 845

Ile Pro Gly Ser Cys Asp Ser Leu Ser Gly Ser Cys Leu Ile Cys Lys  
850 855 860

Pro Gly Thr Thr Gly Arg Tyr Cys Glu Leu Cys Ala Asp Gly Tyr Phe  
865 870 875 880

Gly Asp Ala Val Asn Thr Lys Asn Cys Gln Pro Cys Arg Cys Asp Ile  
885 890 895

Asn Gly Ser Phe Ser Glu Asp Cys His Thr Arg Thr Gly Gln Cys Glu  
900 905 910

Cys Arg Pro Asn Val Gln Gly Arg His Cys Asp Glu Cys Lys Pro Glu  
915 920 925

Thr Phe Gly Leu Gln Leu Gly Arg Gly Cys Leu Pro Cys Asn Cys Asn  
930 935 940

Ser Phe Gly Ser Lys Ser Phe Asp Cys Glu Ala Ser Gly Gln Cys Trp  
945 950 955 960

Cys Gln Pro Gly Val Ala Gly Lys Lys Cys Asp Arg Cys Ala His Gly  
965 970 975

Tyr Phe Asn Phe Gln Glu Gly Gly Cys Ile Ala Cys Asp Cys Ser His  
980 985 990

Leu Gly Asn Asn Cys Asp Pro Lys Thr Gly Gln Cys Ile Cys Pro Pro  
995 1000 1005

Asn Thr Thr Gly Glu Lys Cys Ser Glu Cys Leu Pro Asn Thr Trp  
1010 1015 1020

Gly His Ser Ile Val Thr Gly Cys Lys Val Cys Asn Cys Ser Thr  
1025 1030 1035

Val Gly Ser Leu Ala Ser Gln Cys Asn Val Asn Thr Gly Gln Cys  
1040 1045 1050

Ser Cys His Pro Lys Phe Ser Gly Met Lys Cys Ser Glu Cys Ser  
1055 1060 1065

Arg Gly His Trp Asn Tyr Pro Leu Cys Thr Leu Cys Asp Cys Phe

1070

1075

1080

Leu Pro Gly Thr Asp Ala Thr Thr Cys Asp Leu Glu Thr Arg Lys

1085

1090

1095

Cys Ser Cys Ser Asp Gln Thr Gly Gln Cys Ser Cys Lys Val Asn

1100

1105

1110

Val Glu Gly Val His Cys Asp Arg Cys Arg Pro Gly Lys Phe Gly

1115

1120

1125

Leu Asp Ala Lys Asn Pro Leu Gly Cys Ser Ser Cys Tyr Cys Phe

1130

1135

1140

Gly Val Thr Ser Gln Cys Ser Glu Ala Lys Gly Leu Ile Arg Thr

1145

1150

1155

Trp Val Thr Leu Ser Asp Glu Gln Thr Ile Leu Pro Leu Val Asp

1160

1165

1170

Glu Ala Leu Gln His Thr Thr Thr Lys Gly Ile Ala Phe Gln Lys

1175

1180

1185

Pro Glu Ile Val Ala Lys Met Asp Glu Val Arg Gln Glu Leu His  
1190 1195 1200

Leu Glu Pro Phe Tyr Trp Lys Leu Pro Gln Gln Phe Glu Gly Lys  
1205 1210 1215

Lys Leu Met Ala Tyr Gly Gly Lys Leu Lys Tyr Ala Ile Tyr Phe  
1220 1225 1230

Glu Ala Arg Asp Glu Thr Gly Phe Ala Thr Tyr Lys Pro Gln Val  
1235 1240 1245

Ile Ile Arg Gly Gly Thr Pro Thr His Ala Arg Ile Ile Thr Arg  
1250 1255 1260

His Met Ala Ala Pro Leu Ile Gly Gln Leu Thr Arg His Glu Ile  
1265 1270 1275

Glu Met Thr Glu Lys Glu Trp Lys Tyr Tyr Gly Asp Asp Pro Arg  
1280 1285 1290

Ile Ser Arg Thr Val Thr Arg Glu Asp Phe Leu Asp Ile Leu Tyr  
1295 1300 1305

Asp Ile His Tyr Ile Leu Ile Lys Ala Thr Tyr Gly Asn Val Val  
1310 1315 1320

Arg Gln Ser Arg Ile Ser Glu Ile Ser Met Glu Val Ala Glu Pro  
1325 1330 1335

Gly His Val Leu Ala Gly Ser Pro Pro Ala His Leu Ile Glu Arg  
1340 1345 1350

Cys Asp Cys Pro Pro Gly Tyr Ser Gly Leu Ser Cys Glu Thr Cys  
1355 1360 1365

Ala Pro Gly Phe Tyr Arg Leu Arg Ser Glu Pro Gly Gly Arg Thr  
1370 1375 1380

Pro Gly Pro Thr Leu Gly Thr Cys Val Pro Cys Gln Cys Asn Gly  
1385 1390 1395

His Ser Ser Gln Cys Asp Pro Glu Thr Ser Val Cys Gln Asn Cys  
1400 1405 1410

Gln His His Thr Ala Gly Asp Phe Cys Glu Arg Cys Ala Leu Gly  
1415 1420 1425

Tyr Tyr Gly Ile Val Arg Gly Leu Pro Asn Asp Cys Gln Pro Cys  
1430 1435 1440

Ala Cys Pro Leu Ile Ser Pro Ser Asn Asn Phe Ser Pro Ser Cys  
1445 1450 1455

Val Leu Glu Gly Leu Glu Asp Tyr Arg Cys Thr Ala Cys Pro Arg  
1460 1465 1470

Gly Tyr Glu Gly Gln Tyr Cys Glu Arg Cys Ala Pro Gly Tyr Thr  
1475 1480 1485

Gly Ser Pro Ser Ser Pro Gly Gly Ser Cys Gln Glu Cys Glu Cys  
1490 1495 1500

Asp Pro Tyr Gly Ser Leu Pro Val Pro Cys Asp Arg Val Thr Gly

1505

1510

1515

Leu Cys Thr Cys Arg Pro Gly Ala Thr Gly Arg Lys Cys Asp Gly

1520

1525

1530

Cys Glu His Trp His Ala Arg Glu Gly Ala Glu Cys Val Phe Cys

1535

1540

1545

Gly Asp Glu Cys Thr Gly Leu Leu Leu Gly Asp Leu Ala Arg Leu

1550

1555

1560

Glu Gln Met Thr Met Asn Ile Asn Leu Thr Gly Pro Leu Pro Ala

1565

1570

1575

Pro Tyr Lys Ile Leu Tyr Gly Leu Glu Asn Thr Thr Gln Glu Leu

1580

1585

1590

Lys His Leu Leu Ser Pro Gln Arg Ala Pro Glu Arg Leu Ile Gln

1595

1600

1605

Leu Ala Glu Gly Asn Val Asn Thr Leu Val Met Glu Thr Asn Glu

1610

1615

1620



Leu Leu Thr Arg Ala Thr Lys Val Thr Ala Asp Gly Glu Gln Thr

1625

1630

1635

Gly Gln Asp Ala Glu Arg Thr Asn Ser Arg Ala Glu Ser Leu Glu

1640

1645

1650

Glu Phe Ile Lys Gly Leu Val Gln Asp Ala Glu Ala Ile Asn Glu

1655

1660

1665

Lys Ala Val Lys Leu Asn Glu Thr Leu Gly Asn Gln Asp Lys Thr

1670

1675

1680

Ala Glu Arg Asn Leu Glu Glu Leu Gln Lys Glu Ile Asp Arg Met

1685

1690

1695

Leu Lys Glu Leu Arg Ser Lys Asp Leu Gln Thr Gln Lys Glu Val

1700

1705

1710

Ala Glu Asp Glu Leu Val Ala Ala Glu Gly Leu Leu Lys Arg Val

1715

1720

1725

Asn Lys Leu Phe Gly Glu Pro Arg Ala Gln Asn Glu Asp Met Glu  
1730 1735 1740

Lys Asp Leu Gln Gln Lys Leu Ala Glu Tyr Lys Asn Lys Leu Asp  
1745 1750 1755

Asp Ala Trp Asp Leu Leu Arg Glu Ala Thr Asp Lys Thr Arg Asp  
1760 1765 1770

Ala Asn Arg Leu Ser Ala Ala Asn Gln Lys Asn Met Thr Ile Leu  
1775 1780 1785

Glu Thr Lys Lys Glu Ala Ile Glu Gly Ser Lys Arg Gln Ile Glu  
1790 1795 1800

Asn Thr Leu Lys Glu Gly Asn Asp Ile Leu Asp Glu Ala Asn Gln  
1805 1810 1815

Leu Leu Gly Glu Ile Asn Ser Val Ile Asp Tyr Val Asp Asp Ile  
1820 1825 1830

Lys Thr Lys Leu Pro Pro Met Ser Glu Glu Leu Ser Asp Lys Ile  
1835 1840 1845

Asp Asp Leu Ala Gln Glu Ile Lys Asp Arg Arg Leu Ala Glu Lys  
1850 1855 1860

Val Phe Gln Ala Glu Ser His Ala Ala Gln Leu Asn Asp Ser Ser  
1865 1870 1875

Ala Val Leu Asp Gly Ile Leu Asp Glu Ala Lys Asn Ile Ser Phe  
1880 1885 1890

Asn Ala Thr Ala Ala Phe Arg Ala Tyr Ser Asn Ile Lys Asp Tyr  
1895 1900 1905

Ile Asp Glu Ala Glu Lys Val Ala Arg Glu Ala Lys Glu Leu Ala  
1910 1915 1920

Gln Gly Ala Thr Lys Leu Ala Thr Ser Pro Gln Gly Leu Leu Lys  
1925 1930 1935

Glu Asp Ala Lys Gly Ser Leu Gln Lys Ser Phe Arg Ile Leu Asn

1940

1945

1950

Glu Ala Lys Lys Leu Ala Asn Asp Val Lys Gly Asn His Asn Asp

1955

1960

1965

Leu Asn Asp Leu Lys Thr Arg Leu Glu Thr Ala Asp Leu Arg Asn

1970

1975

1980

Ser Gly Leu Leu Gly Ala Leu Asn Asp Thr Met Asp Lys Leu Ser

1985

1990

1995

Ala Ile Thr Asn Asp Thr Ala Ala Lys Leu Gln Ala Val Lys Glu

2000

2005

2010

Lys Ala Arg Glu Ala Asn Asp Thr Ala Lys Ala Val Leu Ala Gln

2015

2020

2025

Val Lys Asp Leu His Gln Asn Leu Asp Gly Leu Lys Gln Asn Tyr

2030

2035

2040

Asn Lys Leu Ala Asp Ser Val Ala Lys Thr Asn Ala Val Val Lys

2045

2050

2055

Asp Pro Ser Lys Asn Lys Ile Ile Ala Asp Ala Gly Thr Ser Val  
2060 2065 2070

Arg Asn Leu Glu Gln Glu Ala Asp Arg Leu Ile Asp Lys Leu Lys  
2075 2080 2085

Pro Ile Lys Glu Leu Glu Asp Asn Leu Lys Lys Asn Ile Ser Glu  
2090 2095 2100

Ile Lys Glu Leu Ile Asn Gln Ala Arg Lys Gln Ala Asn Ser Ile  
2105 2110 2115

Lys Val Ser Val Ser Ser Gly Gly Asp Cys Val Arg Thr Tyr Arg  
2120 2125 2130

Pro Glu Ile Lys Lys Gly Ser Tyr Asn Asn Ile Val Val His Val  
2135 2140 2145

Lys Thr Ala Val Ala Asp Asn Leu Leu Phe Tyr Leu Gly Ser Ala  
2150 2155 2160

Lys Phe Ile Asp Phe Leu Ala Ile Glu Met Arg Lys Gly Lys Val  
2165 2170 2175

Ser Phe Leu Trp Ile Val Gly Ser Gly Val Gly Arg Val Gly Phe  
2180 2185 2190

Pro Asp Leu Thr Ile Asp Asp Ser Tyr Trp Tyr Arg Ile Glu Ala  
2195 2200 2205

Ser Arg Thr Gly Arg Asn Gly Ser Ile Ser Val Arg Ala Leu Asp  
2210 2215 2220

Gly Pro Lys Ala Ser Met Val Pro Ser Thr Tyr His Ser Val Ser  
2225 2230 2235

Pro Pro Gly Tyr Thr Ile Leu Asp Val Asp Ala Asn Ala Met Leu  
2240 2245 2250

Phe Val Gly Gly Leu Thr Gly Lys Ile Lys Lys Ala Asp Ala Val  
2255 2260 2265

Arg Val Ile Thr Phe Thr Gly Cys Met Gly Glu Thr Tyr Phe Asp  
2270 2275 2280

Asn Lys Pro Ile Gly Leu Trp Asn Phe Arg Glu Lys Glu Gly Asp  
2285 2290 2295

Cys Lys Gly Cys Thr Val Ser Pro Gln Val Glu Asp Ser Glu Gly  
2300 2305 2310

Thr Ile Gln Phe Asp Gly Glu Gly Tyr Ala Leu Val Ser Arg Pro  
2315 2320 2325

Ile Arg Trp Tyr Pro Asn Ile Ser Thr Val Met Phe Lys Phe Arg  
2330 2335 2340

Thr Phe Ser Ser Ser Ala Leu Leu Met Tyr Leu Ala Thr Arg Asp  
2345 2350 2355

Leu Lys Asp Phe Met Ser Val Glu Leu Ser Asp Gly His Val Lys  
2360 2365 2370

Val Ser Tyr Asp Leu Gly Ser Gly Met Thr Ser Val Val Ser Asn  
2375 2380 2385

Gln Asn His Asn Asp Gly Lys Trp Lys Ala Phe Thr Leu Ser Arg  
2390 2395 2400

Ile Gln Lys Gln Ala Asn Ile Ser Ile Val Asp Ile Asp Ser Asn  
2405 2410 2415

Gln Glu Glu Asn Val Ala Thr Ser Ser Ser Gly Asn Asn Phe Gly  
2420 2425 2430

Leu Asp Leu Lys Ala Asp Asp Lys Ile Tyr Phe Gly Gly Leu Pro  
2435 2440 2445

Thr Leu Arg Asn Leu Ser Met Lys Ala Arg Pro Glu Val Asn Val  
2450 2455 2460

Lys Lys Tyr Ser Gly Cys Leu Lys Asp Ile Glu Ile Ser Arg Thr  
2465 2470 2475

Pro Tyr Asn Ile Leu Ser Ser Pro Asp Tyr Val Gly Val Thr Lys



2480

2485

2490

Gly Cys Ser Leu Glu Asn Val Asn Thr Val Ser Phe Pro Lys Pro

2495

2500

2505

Gly Phe Val Glu Leu Ala Ala Val Ser Ile Asp Val Gly Thr Glu

2510

2515

2520

Ile Asn Leu Ser Phe Ser Thr Arg Asn Glu Ser Gly Ile Ile Leu

2525

2530

2535

Leu Gly Ser Gly Gly Thr Leu Thr Pro Pro Arg Arg Lys Arg Arg

2540

2545

2550

Gln Thr Thr Gln Ala Tyr Tyr Ala Ile Phe Leu Asn Lys Gly Arg

2555

2560

2565

Leu Glu Val His Leu Ser Ser Gly Thr Arg Thr Met Arg Lys Ile

2570

2575

2580

Val Ile Lys Pro Glu Pro Asn Leu Phe His Asp Gly Arg Glu His

2585

2590

2595

Ser Val His Val Glu Arg Thr Arg Gly Ile Phe Thr Val Gln Ile  
2600 2605 2610

Asp Glu Asp Arg Arg His Ile Gln Asn Leu Thr Glu Glu Gln Pro  
2615 2620 2625

Ile Glu Val Lys Lys Leu Phe Val Gly Gly Ala Pro Pro Glu Phe  
2630 2635 2640

Gln Pro Ser Pro Leu Arg Asn Ile Pro Ala Phe Gln Gly Cys Val  
2645 2650 2655

Trp Asn Leu Val Ile Asn Ser Ile Pro Met Asp Phe Ala Gln Pro  
2660 2665 2670

Ile Ala Phe Lys Asn Ala Asp Ile Gly Arg Cys Thr Tyr Gln Lys  
2675 2680 2685

Pro Arg Glu Asp Glu Ser Glu Ala Val Pro Ala Glu Val Ile Val  
2690 2695 2700

Gln Pro Gln Ser Val Pro Thr Pro Ala Phe Pro Phe Pro Val Pro  
2705 2710 2715

Thr Met Val His Gly Pro Cys Val Ala Glu Ser Glu Pro Ala Leu  
2720 2725 2730

Leu Thr Gly Ser Lys Gln Phe Gly Leu Ser Arg Asn Ser His Ile  
2735 2740 2745

Ala Ile Val Phe Asp Asp Thr Lys Val Lys Asn Arg Leu Thr Ile  
2750 2755 2760

Glu Leu Glu Val Arg Thr Glu Ala Glu Ser Gly Leu Leu Phe Tyr  
2765 2770 2775

Met Gly Arg Ile Asn His Ala Asp Phe Gly Thr Val Gln Leu Arg  
2780 2785 2790

Asn Gly Phe Pro Phe Phe Ser Tyr Asp Leu Gly Ser Gly Ser Thr  
2795 2800 2805

Arg Thr Met Ile Pro Thr Lys Ile Asn Asp Gly Gln Trp His Lys  
2810 2815 2820

Ile Lys Ile Val Arg Val Lys Gln Glu Gly Ile Leu Tyr Val Asp  
2825 2830 2835

Asp Ala Ser Ser Gln Thr Ile Ser Pro Lys Lys Ala Asp Ile Leu  
2840 2845 2850

Asp Val Gly Gly Ile Leu Tyr Val Gly Gly Leu Pro Ile Asn Tyr  
2855 2860 2865

Thr Thr Arg Arg Ile Gly Pro Val Thr Tyr Ser Leu Asp Gly Cys  
2870 2875 2880

Val Arg Asn Leu His Met Glu Gln Ala Pro Val Asp Leu Asp Gln  
2885 2890 2895

Pro Thr Ser Ser Phe His Val Gly Thr Cys Phe Ala Asn Ala Glu  
2900 2905 2910

Ser Gly Thr Tyr Phe Asp Gly Thr Gly Phe Gly Lys Ala Val Gly

2915

2920

2925

Gly Phe Ile Val Gly Leu Asp Leu Leu Val Glu Phe Glu Phe Arg

2930

2935

2940

Thr Thr Arg Pro Thr Gly Val Leu Leu Gly Ile Ser Ser Gln Lys

2945

2950

2955

Met Asp Gly Met Gly Ile Glu Met Ile Asp Glu Lys Leu Met Phe

2960

2965

2970

His Val Asp Asn Gly Ala Gly Arg Phe Thr Ala Ile Tyr Asp Ala

2975

2980

2985

Glu Ile Pro Gly His Met Cys Asn Gly Gln Trp Tyr Lys Val Thr

2990

2995

3000

Ala Lys Lys Ile Lys Asn Arg Leu Glu Leu Val Val Asp Gly Asn

3005

3010

3015

Gln Val Asp Ala Gln Ser Pro Asn Ser Ala Ser Thr Ser Ala Asp

3020

3025

3030

Thr Asn Asp Pro Val Phe Val Gly Gly Phe Pro Gly Gly Leu Asn

3035

3040

3045

Gln Phe Gly Leu Thr Thr Asn Ile Arg Phe Arg Gly Cys Ile Arg

3050

3055

3060

Ser Leu Lys Leu Thr Lys Gly Thr Ala Asn Arg Trp Arg Leu Ile

3065

3070

3075

Leu Pro Arg Pro Trp Asn

3080

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 5583

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (42)..(5441)

&lt;223&gt; laminin, beta 2

&lt;400&gt; 7

ccacgcgtcc gggacaccag cccagtagcc acacggtcgg g atg gag tgg gcc tca	56
Met Glu Trp Ala Ser	
1 5	
gga gaa cca ggg agg ggc agg cag gga cag cct ttg cca tgg gaa ctt	104
Gly Glu Pro Gly Arg Gly Arg Gln Gly Gln Pro Leu Pro Trp Glu Leu	
10 15 20	
cgc ttg ggc cta ctt cta agt gtg ctg gct gcc aca ttg gcc cag gcc	152
Arg Leu Gly Leu Leu Leu Ser Val Leu Ala Ala Thr Leu Ala Gln Ala	
25 30 35	
ccg tcc ttg gat gta cct ggc tgt tct cga gga agc tgc tat cca gcc	200
Pro Ser Leu Asp Val Pro Gly Cys Ser Arg Gly Ser Cys Tyr Pro Ala	
40 45 50	
acc ggt gac ctg ttg gtg ggc cgt gcg gac aga ctg acg gcc tca tcc	248
Thr Gly Asp Leu Leu Val Gly Arg Ala Asp Arg Leu Thr Ala Ser Ser	
55 60 65	
acg tgt ggc ttg cat agc cct caa ccc tac tgt att gtc agt cac ctg	296
Thr Cys Gly Leu His Ser Pro Gln Pro Tyr Cys Ile Val Ser His Leu	
70 75 80 85	
cag gac gaa aag aag tgt ttc ctg tgt gac tcc cga cgt ccc ttc tct	344
Gln Asp Glu Lys Lys Cys Phe Leu Cys Asp Ser Arg Arg Pro Phe Ser	
90 95 100	

gct cga gac aac cca aat agt cat cgg atc cag aat gta gtc acc agc 392

Ala Arg Asp Asn Pro Asn Ser His Arg Ile Gln Asn Val Val Thr Ser

105

110

115

ttt gcg cca caa cgc cgg acg gcc tgg tgg caa tcg gag aac ggg gtt 440

Phe Ala Pro Gln Arg Arg Thr Ala Trp Trp Gln Ser Glu Asn Gly Val

120

125

130

cca atg gtc acc atc caa ctg gac ctg gaa gct gag ttt cat ttc acc 488

Pro Met Val Thr Ile Gln Leu Asp Leu Glu Ala Glu Phe His Phe Thr

135

140

145

cac ctc att atg acg ttc aag acg ttc cgg cct gct gct atg ctg gtg 536

His Leu Ile Met Thr Phe Lys Thr Phe Arg Pro Ala Ala Met Leu Val

150

155

160

165

gag cgt tct gca gac ttt ggc cgc acc tgg cac gtg tac cga tat ttt 584

Glu Arg Ser Ala Asp Phe Gly Arg Thr Trp His Val Tyr Arg Tyr Phe

170

175

180

tcc tat gac tgc ggg gct gac ttc ccg gga atc cca ctg gcc ccg cca 632

Ser Tyr Asp Cys Gly Ala Asp Phe Pro Gly Ile Pro Leu Ala Pro Pro

185

190

195

cgt cgc tgg gat gat gta gtg tgt gag tcc cgc tac tca gaa atc gag 680

Arg Arg Trp Asp Asp Val Val Cys Glu Ser Arg Tyr Ser Glu Ile Glu

200

205

210



ccg tct acg gaa ggc gag gtc atc tat cgt gtg ctg gac cct gct att 728  
Pro Ser Thr Glu Gly Glu Val Ile Tyr Arg Val Leu Asp Pro Ala Ile  
215 220 225

cct atc cca gac ccc tac agc tca cgg att cag aac ctg ttg aag atc 776  
Pro Ile Pro Asp Pro Tyr Ser Ser Arg Ile Gln Asn Leu Leu Lys Ile  
230 235 240 245

acc aac cta cga gtg aac tta acc cgg ctt cac aca ctg gga gac aac 824  
Thr Asn Leu Arg Val Asn Leu Thr Arg Leu His Thr Leu Gly Asp Asn  
250 255 260

ttg ctt gac cca cgg agg gag atc cgg gaa aaa tac tat tat gct ctc 872  
Leu Leu Asp Pro Arg Arg Glu Ile Arg Glu Lys Tyr Tyr Tyr Ala Leu  
265 270 275

tat gaa ctt gtc atc cgt ggc aac tgc ttc tgc tat ggc cac gcc tca 920  
Tyr Glu Leu Val Ile Arg Gly Asn Cys Phe Cys Tyr Gly His Ala Ser  
280 285 290

cag tgt gcg cct gca cca ggg gcg ccg gcc cat gct gag ggc atg gta 968  
Gln Cys Ala Pro Ala Pro Gly Ala Pro Ala His Ala Glu Gly Met Val  
295 300 305

cac gga gcc tgt atc tgc aag cac aat act cgt gga ctc aac tgt gag 1016  
His Gly Ala Cys Ile Cys Lys His Asn Thr Arg Gly Leu Asn Cys Glu  
310 315 320 325

cag tgt cag gat ttc tat cag gac ctt ccc tgg cac cct gca gag gac 1064

Gln Cys Gln Asp Phe Tyr Gln Asp Leu Pro Trp His Pro Ala Glu Asp  
 330 335 340

ggc cat act cac gcc tgt cgg aag tgt gag tgc aac ggg cat act cat 1112  
 Gly His Thr His Ala Cys Arg Lys Cys Glu Cys Asn Gly His Thr His  
 345 350 355

agc tgc cac ttt gac atg gct gtc tac ctg gca tct gga aat gta agt 1160  
 Ser Cys His Phe Asp Met Ala Val Tyr Leu Ala Ser Gly Asn Val Ser  
 360 365 370

gga ggc gta tgc gat ggg tgt cag cac aac aca gct ggg cgc cat tgt 1208  
 Gly Gly Val Cys Asp Gly Cys Gln His Asn Thr Ala Gly Arg His Cys  
 375 380 385

gag ttc tgc cgg ccc ttc ttc tac cgt gac ccc acc aag gac atg cgg 1256  
 Glu Phe Cys Arg Pro Phe Phe Tyr Arg Asp Pro Thr Lys Asp Met Arg  
 390 395 400 405

gac cca gct gtg tgc cgt cct tgt gac tgt gac cct atg ggt tct caa 1304  
 Asp Pro Ala Val Cys Arg Pro Cys Asp Cys Asp Pro Met Gly Ser Gln  
 410 415 420

gat ggt ggt cgc tgt gat tct cat gat gac cct gtg cta gga ctg gtc 1352  
 Asp Gly Gly Arg Cys Asp Ser His Asp Asp Pro Val Leu Gly Leu Val  
 425 430 435

tca ggc cag tgt cgc tgc aaa gaa cac gtg gtt ggc act cgc tgc cag 1400  
 Ser Gly Gln Cys Arg Cys Lys Glu His Val Val Gly Thr Arg Cys Gln

440	445	450	
caa tgc cgt gat ggc ttc ttt gga ctt agt gcc agt gac cct cga ggg			1448
Gln Cys Arg Asp Gly Phe Phe Gly Leu Ser Ala Ser Asp Pro Arg Gly			
455	460	465	
tgc cag cgt tgc cag tgt aat tca cgg ggc aca gtg cct ggg agc tcc			1496
Cys Gln Arg Cys Gln Cys Asn Ser Arg Gly Thr Val Pro Gly Ser Ser			
470	475	480	485
cct tgt gac tcc agt agt gga acc tgt ttc tgc aag cgt ctg gtg acc			1544
Pro Cys Asp Ser Ser Ser Gly Thr Cys Phe Cys Lys Arg Leu Val Thr			
490	495	500	
gga cat ggc tgt gac cgc tgt ctg cct ggc cac tgg ggc ctg agc cat			1592
Gly His Gly Cys Asp Arg Cys Leu Pro Gly His Trp Gly Leu Ser His			
505	510	515	
gac ctg ctg ggc tgc cgt ccc tgt gac tgt gat gtg ggc ggt gcc ttg			1640
Asp Leu Leu Gly Cys Arg Pro Cys Asp Cys Asp Val Gly Gly Ala Leu			
520	525	530	
gat cct cag tgt gat gag gcc acc ggt cag tgc cgc tgc cgc caa cac			1688
Asp Pro Gln Cys Asp Glu Ala Thr Gly Gln Cys Arg Cys Arg Gln His			
535	540	545	
atg att ggg cgg cgc tgc gaa caa gtg cag cct ggc tac ttc cgg cct			1736
Met Ile Gly Arg Arg Cys Glu Gln Val Gln Pro Gly Tyr Phe Arg Pro			
550	555	560	565

ttt ctg gac cat tta acc tgg gag gct gag gct gcc caa ggg cag ggg	1784
Phe Leu Asp His Leu Thr Trp Glu Ala Glu Ala Ala Gln Gly Gln Gly	
570 575 580	
ctt gag gtg gta gag cgg ctg gtg acc aac cga gag act ccg tcc tgg	1832
Leu Glu Val Val Glu Arg Leu Val Thr Asn Arg Glu Thr Pro Ser Trp	
585 590 595	
act ggc cca ggc ttt gtg cgg ctg cga gaa ggt cag gaa gtg gag ttc	1880
Thr Gly Pro Gly Phe Val Arg Leu Arg Glu Gly Gln Glu Val Glu Phe	
600 605 610	
ctg gtg acc tct ttg cct agg gcc atg gac tat gac ctg cta ctg cgc	1928
Leu Val Thr Ser Leu Pro Arg Ala Met Asp Tyr Asp Leu Leu Leu Arg	
615 620 625	
tgg gag ccc cag gtc cct gag caa tgg gca gag ctg gaa ctg atg gtg	1976
Trp Glu Pro Gln Val Pro Glu Gln Trp Ala Glu Leu Glu Leu Met Val	
630 635 640 645	
cag cgt ccg ggg cct gtg tct gct cac agt ccg tgc ggg cat gtg ctg	2024
Gln Arg Pro Gly Pro Val Ser Ala His Ser Pro Cys Gly His Val Leu	
650 655 660	
cct aag gat gac cgc att cag ggg atg ctt cac cca aac acc agg ttt	2072
Pro Lys Asp Asp Arg Ile Gln Gly Met Leu His Pro Asn Thr Arg Phe	
665 670 675	

ttg gtg ttt ccc aga cct gtc tgc ctt gag cct ggc atc tcc tac aag 2120  
 Leu Val Phe Pro Arg Pro Val Cys Leu Glu Pro Gly Ile Ser Tyr Lys  
 680 685 690

ctg aag ctg aaa ctg atc gga aca ggg gga cga gcc cag cct gaa acc 2168  
 Leu Lys Leu Lys Leu Ile Gly Thr Gly Gly Arg Ala Gln Pro Glu Thr  
 695 700 705

tcc tac tct gga tta ctc att gac tcg ctg gtc ctg cag ccc cac gtc 2216  
 Ser Tyr Ser Gly Leu Leu Ile Asp Ser Leu Val Leu Gln Pro His Val  
 710 715 720 725

ttg gtg cta gag atg ttt agt ggg ggc gat gct gct gct ctg gag cgc 2264  
 Leu Val Leu Glu Met Phe Ser Gly Gly Asp Ala Ala Ala Leu Glu Arg  
 730 735 740

cgt acc acc ttt gaa cgc tac cgc tgc cat gag gaa ggt ctg atg ccc 2312  
 Arg Thr Thr Phe Glu Arg Tyr Arg Cys His Glu Glu Gly Leu Met Pro  
 745 750 755

agc aag gcc cct cta tct gag acc tgt gcc ccc ctc ctc atc agc gtg 2360  
 Ser Lys Ala Pro Leu Ser Glu Thr Cys Ala Pro Leu Leu Ile Ser Val  
 760 765 770

tcc gcc ttg atc tac aat ggc gcc ttg cca tgt cag tgt gac cct caa 2408  
 Ser Ala Leu Ile Tyr Asn Gly Ala Leu Pro Cys Gln Cys Asp Pro Gln  
 775 780 785

ggc tca ctg agt tct gaa tgc agt cct cac ggt ggc cag tgc cgg tgc 2456

Gly Ser Leu Ser Ser Glu Cys Ser Pro His Gly Gly Gln Cys Arg Cys  
790 795 800 805

aaa cct gga gtg gtt gga cgc cgt tgt gat gtc tgt gct act ggc tac 2504  
Lys Pro Gly Val Val Gly Arg Arg Cys Asp Val Cys Ala Thr Gly Tyr  
810 815 820

tat ggc ttt ggc cct gca ggc tgt caa gcc tgc cag tgt agt cct gat 2552  
Tyr Gly Phe Gly Pro Ala Gly Cys Gln Ala Cys Gln Cys Ser Pro Asp  
825 830 835

gga gca ctc agt gcc ctc tgt gaa ggg act agt gga cag tgc ccc tgc 2600  
Gly Ala Leu Ser Ala Leu Cys Glu Gly Thr Ser Gly Gln Cys Pro Cys  
840 845 850

cga cct ggt gcc ttt ggt ctt cgc tgt gac cac tgt caa cgt ggc cag 2648  
Arg Pro Gly Ala Phe Gly Leu Arg Cys Asp His Cys Gln Arg Gly Gln  
855 860 865

tgg gga ttc cct aat tgc cgg ccg tgt gtc tgc aat ggg cgt gcg gat 2696  
Trp Gly Phe Pro Asn Cys Arg Pro Cys Val Cys Asn Gly Arg Ala Asp  
870 875 880 885

gag tgt gat acc cac aca ggc gct tgc ctg ggc tgc cgt gat tac acg 2744  
Glu Cys Asp Thr His Thr Gly Ala Cys Leu Gly Cys Arg Asp Tyr Thr  
890 895 900

ggg ggc gag cac tgt gaa agg tgc att gct ggt ttt cat ggg gac cca 2792  
Gly Gly Glu His Cys Glu Arg Cys Ile Ala Gly Phe His Gly Asp Pro

905	910	915	
cgg ctg cca tat ggg ggc cag tgc cgg cct tgt ccc tgc cct gaa ggc			2840
Arg Leu Pro Tyr Gly Gly Gln Cys Arg Pro Cys Pro Cys Pro Glu Gly			
920	925	930	
cct ggg agc cag cga cac ttt gct act tct tgc cac cgg gat gga tat			2888
Pro Gly Ser Gln Arg His Phe Ala Thr Ser Cys His Arg Asp Gly Tyr			
935	940	945	
tcc cag caa att gtg tgc cag tgt cga gaa ggc tac aca ggg ctt cgg			2936
Ser Gln Gln Ile Val Cys Gln Cys Arg Glu Gly Tyr Thr Gly Leu Arg			
950	955	960	965
tgt gaa gct tgt gcc ccc ggg cac ttt ggg gac cca tca aag cca ggt			2984
Cys Glu Ala Cys Ala Pro Gly His Phe Gly Asp Pro Ser Lys Pro Gly			
970	975	980	
ggc agg tgc caa ctg tgt gag tgc agt gga aac att gat ccc atg gac			3032
Gly Arg Cys Gln Leu Cys Glu Cys Ser Gly Asn Ile Asp Pro Met Asp			
985	990	995	
cct gat gcc tgt gat ccc cac acg ggg caa tgc ttg cgt tgt tta			3077
Pro Asp Ala Cys Asp Pro His Thr Gly Gln Cys Leu Arg Cys Leu			
1000	1005	1010	
cac aac aca gag ggg ccc cac tgt ggc tat tgc aag cct ggc ttc			3122
His Asn Thr Glu Gly Pro His Cys Gly Tyr Cys Lys Pro Gly Phe			
1015	1020	1025	

cat ggg caa gct gcc cga cag agc tgt cac cgc tgt acc tgc aac 3167  
His Gly Gln Ala Ala Arg Gln Ser Cys His Arg Cys Thr Cys Asn  
1030 1035 1040

ctt ctg ggc aca gat ccc agg cgg tgc cca tct acc gac ctg tgc 3212  
Leu Leu Gly Thr Asp Pro Arg Arg Cys Pro Ser Thr Asp Leu Cys  
1045 1050 1055

cat tgt gac cca agc act ggg cag tgc cca tgc ctt ccc cat gtc 3257  
His Cys Asp Pro Ser Thr Gly Gln Cys Pro Cys Leu Pro His Val  
1060 1065 1070

caa ggc ctc aac tgt gac cat tgt gcc ccc aac ttt tgg aac ttc 3302  
Gln Gly Leu Asn Cys Asp His Cys Ala Pro Asn Phe Trp Asn Phe  
1075 1080 1085

acc agt ggc cgt ggc tgc cag cct tgt gct tgt cac cca agc cgg 3347  
Thr Ser Gly Arg Gly Cys Gln Pro Cys Ala Cys His Pro Ser Arg  
1090 1095 1100

gcc aga ggc cct acc tgc aat gag ttc aca ggg cag tgt cac tgt 3392  
Ala Arg Gly Pro Thr Cys Asn Glu Phe Thr Gly Gln Cys His Cys  
1105 1110 1115

cat gct ggc ttt ggt ggg agg act tgt tct gag tgc caa gag ctc 3437  
His Ala Gly Phe Gly Gly Arg Thr Cys Ser Glu Cys Gln Glu Leu  
1120 1125 1130



tac tgg gga	gac cct ggt ctg cag	tgc cgt gcc tgt gac	tgt gat	3482
Tyr Trp Gly	Asp Pro Gly Leu Gln	Cys Arg Ala Cys Asp	Cys Asp	
1135	1140	1145		
cct aga gga	ata gac aaa cct cag	tgt cat cgt tcc aca	ggc cac	3527
Pro Arg Gly	Ile Asp Lys Pro Gln	Cys His Arg Ser Thr	Gly His	
1150	1155	1160		
tgt agc tgc	cgc cca ggc gtg tct	ggc gtg cgc tgt gac	cag tgt	3572
Cys Ser Cys	Arg Pro Gly Val Ser	Gly Val Arg Cys Asp	Gln Cys	
1165	1170	1175		
gct cgt ggc	ttc tca ggg gtt ttt	cct gct tgt cac ccc	tgc cac	3617
Ala Arg Gly	Phe Ser Gly Val Phe	Pro Ala Cys His Pro	Cys His	
1180	1185	1190		
gct tgc ttt	gga gac tgg gat cgt	gtg gta cag gac ctg	gct gct	3662
Ala Cys Phe	Gly Asp Trp Asp Arg	Val Val Gln Asp Leu	Ala Ala	
1195	1200	1205		
cgg acg cgg	cgc ctg gag cag tgg	gct cag gag ttg cag	caa aca	3707
Arg Thr Arg	Arg Leu Glu Gln Trp	Ala Gln Glu Leu Gln	Gln Thr	
1210	1215	1220		
gga gtg ctg	ggc gcc ttt gag agc	agc ttt ttg aac atg	cag ggg	3752
Gly Val Leu	Gly Ala Phe Glu Ser	Ser Phe Leu Asn Met	Gln Gly	
1225	1230	1235		
aag cta ggc	atg gtg cag gcc att	atg agt gcc cgc aat	gcc tca	3797

Lys Leu Gly Met Val Gln Ala Ile Met Ser Ala Arg Asn Ala Ser  
 1240 1245 1250

gcc gcc tct acg gcg aag ctt gta gag gcc aca gag gga cta cgt 3842  
 Ala Ala Ser Thr Ala Lys Leu Val Glu Ala Thr Glu Gly Leu Arg  
 1255 1260 1265

cat gaa atc ggg aag acc acc gag cgc ctg act cag tta gaa gca 3887  
 His Glu Ile Gly Lys Thr Thr Glu Arg Leu Thr Gln Leu Glu Ala  
 1270 1275 1280

gag cta aca gct gtg cag gat gag aac ttc aat gcc aac cat gca 3932  
 Glu Leu Thr Ala Val Gln Asp Glu Asn Phe Asn Ala Asn His Ala  
 1285 1290 1295

ctc agt ggt ctg gag aga gac ggg ctt gcg ctt aat ctc acc ctg 3977  
 Leu Ser Gly Leu Glu Arg Asp Gly Leu Ala Leu Asn Leu Thr Leu  
 1300 1305 1310

agg cag ctg gat cag cat ctg gag atc ctc aaa cat tca aat ttc 4022  
 Arg Gln Leu Asp Gln His Leu Glu Ile Leu Lys His Ser Asn Phe  
 1315 1320 1325

tta ggt gcc tat gac agc atc cga cat gcc cac agc cag tcc aca 4067  
 Leu Gly Ala Tyr Asp Ser Ile Arg His Ala His Ser Gln Ser Thr  
 1330 1335 1340

gag gca gag cgc cgt gcc aac gcc tcc acc ttt gca gta ccc agc 4112  
 Glu Ala Glu Arg Arg Ala Asn Ala Ser Thr Phe Ala Val Pro Ser

1345	1350	1355	
cct gtg agc aac tca gca gat acc	cgg cgt cgg acg gaa	gtg cta	4157
Pro Val Ser Asn Ser Ala Asp Thr	Arg Arg Arg Thr Glu	Val Leu	
1360	1365	1370	
atg ggt gcc caa aaa gaa aac ttc	aac cgc caa cat ttg	gcc aac	4202
Met Gly Ala Gln Lys Glu Asn Phe	Asn Arg Gln His Leu	Ala Asn	
1375	1380	1385	
cag cag gca ctg gga cgg ctc tct	gca cat gcc cac acc	ctg agc	4247
Gln Gln Ala Leu Gly Arg Leu Ser	Ala His Ala His Thr	Leu Ser	
1390	1395	1400	
ctg acg ggc ata aat gag ttg gtg	tgt ggg gca cca ggg	gac gca	4292
Leu Thr Gly Ile Asn Glu Leu Val	Cys Gly Ala Pro Gly	Asp Ala	
1405	1410	1415	
ccc tgt gcc acc agc cct tgt ggg	ggt gcc gga tgt cgg	gat gaa	4337
Pro Cys Ala Thr Ser Pro Cys Gly	Gly Ala Gly Cys Arg	Asp Glu	
1420	1425	1430	
gat ggg cag ccc cgt tgt ggt ggc	ctc ggt tgc agt ggg	gca gca	4382
Asp Gly Gln Pro Arg Cys Gly Gly	Leu Gly Cys Ser Gly	Ala Ala	
1435	1440	1445	
gcc acg gca gat cta gcg ctg ggc	cgg gct cgg cac acg	cag gca	4427
Ala Thr Ala Asp Leu Ala Leu Gly	Arg Ala Arg His Thr	Gln Ala	
1450	1455	1460	

gag ctg cag	cgg gca ctg gta gaa	ggt ggc ggc atc ctc	agc cgg	4472
Glu Leu Gln	Arg Ala Leu Val Glu	Gly Gly Gly Ile Leu	Ser Arg	
1465	1470	1475		
gtg tct gag	act cgt cgg cag gca	gaa gag gca cag cag	cga gca	4517
Val Ser Glu	Thr Arg Arg Gln Ala	Glu Glu Ala Gln Gln	Arg Ala	
1480	1485	1490		
cag gca gcc	ctg gac aag gct aat	gct tcc agg ggc cag	gtg gaa	4562
Gln Ala Ala	Leu Asp Lys Ala Asn	Ala Ser Arg Gly Gln	Val Glu	
1495	1500	1505		
cag gcc aat	cag gag ctt cga gaa	ctt atc cag aat gtg	aaa gac	4607
Gln Ala Asn	Gln Glu Leu Arg Glu	Leu Ile Gln Asn Val	Lys Asp	
1510	1515	1520		
ttc ctc agc	cag gag gga gcc gat	cct gac agt att gaa	atg gta	4652
Phe Leu Ser	Gln Glu Gly Ala Asp	Pro Asp Ser Ile Glu	Met Val	
1525	1530	1535		
gcg act cgg	gtg cta gac atc tcc	atc ccg gcc tca ccc	gag cag	4697
Ala Thr Arg	Val Leu Asp Ile Ser	Ile Pro Ala Ser Pro	Glu Gln	
1540	1545	1550		
atc cag cgc	cta gcc agt gag att	gca gaa cgc gtc cga	agc ctg	4742
Ile Gln Arg	Leu Ala Ser Glu Ile	Ala Glu Arg Val Arg	Ser Leu	
1555	1560	1565		

gcc gac gtg gac aca atc ctg gcc cat acc atg ggc gac gtg cgt 4787  
Ala Asp Val Asp Thr Ile Leu Ala His Thr Met Gly Asp Val Arg  
1570 1575 1580

cgg gct gaa cag cta ctg caa gat gcg cac cgg gca cgg agc cgg 4832  
Arg Ala Glu Gln Leu Leu Gln Asp Ala His Arg Ala Arg Ser Arg  
1585 1590 1595

gcc gag ggt gag aga cag aag gca gag aca gtc caa gcg gca ctg 4877  
Ala Glu Gly Glu Arg Gln Lys Ala Glu Thr Val Gln Ala Ala Leu  
1600 1605 1610

gag gag gct cag agg gca caa gga gct gct cag ggt gcc atc tgg 4922  
Glu Glu Ala Gln Arg Ala Gln Gly Ala Ala Gln Gly Ala Ile Trp  
1615 1620 1625

gga gca gtg gtt gac aca caa aac aca gag cag acc ctg cag cgg 4967  
Gly Ala Val Val Asp Thr Gln Asn Thr Glu Gln Thr Leu Gln Arg  
1630 1635 1640

gtc cag gag agg atg gca ggt gca gag aag tct ctg aac tct gcc 5012  
Val Gln Glu Arg Met Ala Gly Ala Glu Lys Ser Leu Asn Ser Ala  
1645 1650 1655

ggt gag cgg gct cgg caa tta gac gcc ctc ctg gag gcc ctg aaa 5057  
Gly Glu Arg Ala Arg Gln Leu Asp Ala Leu Leu Glu Ala Leu Lys  
1660 1665 1670

ctg aaa cgg gca gga aat agc ctg gca gca tct aca gcg gaa gaa 5102

Leu Lys Arg Ala Gly Asn Ser Leu Ala Ala Ser Thr Ala Glu Glu  
 1675 1680 1685

aca gca ggc agt gcc cag agc cgt gcc agg gag gct gag aaa caa 5147  
 Thr Ala Gly Ser Ala Gln Ser Arg Ala Arg Glu Ala Glu Lys Gln  
 1690 1695 1700

cta cgg gaa caa gta ggt gac caa tac caa aca gtg agg gcg ttg 5192  
 Leu Arg Glu Gln Val Gly Asp Gln Tyr Gln Thr Val Arg Ala Leu  
 1705 1710 1715

gca gag cgg aag gct gaa ggt gtt ctg gct gca caa gcc agg gca 5237  
 Ala Glu Arg Lys Ala Glu Gly Val Leu Ala Ala Gln Ala Arg Ala  
 1720 1725 1730

gaa caa ctg cgg gat gag gct cgg gac ctg ttg cag gcc gct cag 5282  
 Glu Gln Leu Arg Asp Glu Ala Arg Asp Leu Leu Gln Ala Ala Gln  
 1735 1740 1745

gat aag ctg cag cgg cta cag gag ctg gag ggc aca tat gag gag 5327  
 Asp Lys Leu Gln Arg Leu Gln Glu Leu Glu Gly Thr Tyr Glu Glu  
 1750 1755 1760

aac gag cgt gca ctg gag ggc aaa gcg gcc cag ctg gat ggg ctg 5372  
 Asn Glu Arg Ala Leu Glu Gly Lys Ala Ala Gln Leu Asp Gly Leu  
 1765 1770 1775

gaa gcc agg atg cgc agt gtg ctc cag gcc atc aac ttg cag gtc 5417  
 Glu Ala Arg Met Arg Ser Val Leu Gln Ala Ile Asn Leu Gln Val

1780

1785

1790

cag atc tac aac acc tgc cag tga ccactcccta gggcctagcc ttgtcgccaa 5471

Gln Ile Tyr Asn Thr Cys Gln

1795

gcactgttct gcacacgatac gtccgcacat taaagagctc ctggctagca agagctttca 5531

ataaacctgt gtgaacctca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 5583

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 1799

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 8

Met Glu Trp Ala Ser Gly Glu Pro Gly Arg Gly Arg Gln Gly Gln Pro

1

5

10

15

Leu Pro Trp Glu Leu Arg Leu Gly Leu Leu Leu Ser Val Leu Ala Ala

20

25

30

Thr Leu Ala Gln Ala Pro Ser Leu Asp Val Pro Gly Cys Ser Arg Gly

35

40

45

Ser Cys Tyr Pro Ala Thr Gly Asp Leu Leu Val Gly Arg Ala Asp Arg  
50 55 60

Leu Thr Ala Ser Ser Thr Cys Gly Leu His Ser Pro Gln Pro Tyr Cys  
65 70 75 80

Ile Val Ser His Leu Gln Asp Glu Lys Lys Cys Phe Leu Cys Asp Ser  
85 90 95

Arg Arg Pro Phe Ser Ala Arg Asp Asn Pro Asn Ser His Arg Ile Gln  
100 105 110

Asn Val Val Thr Ser Phe Ala Pro Gln Arg Arg Thr Ala Trp Trp Gln  
115 120 125

Ser Glu Asn Gly Val Pro Met Val Thr Ile Gln Leu Asp Leu Glu Ala  
130 135 140

Glu Phe His Phe Thr His Leu Ile Met Thr Phe Lys Thr Phe Arg Pro  
145 150 155 160



Ala Ala Met Leu Val Glu Arg Ser Ala Asp Phe Gly Arg Thr Trp His  
165 170 175

Val Tyr Arg Tyr Phe Ser Tyr Asp Cys Gly Ala Asp Phe Pro Gly Ile  
180 185 190

Pro Leu Ala Pro Pro Arg Arg Trp Asp Asp Val Val Cys Glu Ser Arg  
195 200 205

Tyr Ser Glu Ile Glu Pro Ser Thr Glu Gly Glu Val Ile Tyr Arg Val  
210 215 220

Leu Asp Pro Ala Ile Pro Ile Pro Asp Pro Tyr Ser Ser Arg Ile Gln  
225 230 235 240

Asn Leu Leu Lys Ile Thr Asn Leu Arg Val Asn Leu Thr Arg Leu His  
245 250 255

Thr Leu Gly Asp Asn Leu Leu Asp Pro Arg Arg Glu Ile Arg Glu Lys  
260 265 270

Tyr Tyr Tyr Ala Leu Tyr Glu Leu Val Ile Arg Gly Asn Cys Phe Cys

275

280

285

Tyr Gly His Ala Ser Gln Cys Ala Pro Ala Pro Gly Ala Pro Ala His

290

295

300

Ala Glu Gly Met Val His Gly Ala Cys Ile Cys Lys His Asn Thr Arg

305

310

315

320

Gly Leu Asn Cys Glu Gln Cys Gln Asp Phe Tyr Gln Asp Leu Pro Trp

325

330

335

His Pro Ala Glu Asp Gly His Thr His Ala Cys Arg Lys Cys Glu Cys

340

345

350

Asn Gly His Thr His Ser Cys His Phe Asp Met Ala Val Tyr Leu Ala

355

360

365

Ser Gly Asn Val Ser Gly Gly Val Cys Asp Gly Cys Gln His Asn Thr

370

375

380

Ala Gly Arg His Cys Glu Phe Cys Arg Pro Phe Phe Tyr Arg Asp Pro

385

390

395

400

Thr Lys Asp Met Arg Asp Pro Ala Val Cys Arg Pro Cys Asp Cys Asp  
405 410 415

Pro Met Gly Ser Gln Asp Gly Gly Arg Cys Asp Ser His Asp Asp Pro  
420 425 430

Val Leu Gly Leu Val Ser Gly Gln Cys Arg Cys Lys Glu His Val Val  
435 440 445

Gly Thr Arg Cys Gln Gln Cys Arg Asp Gly Phe Phe Gly Leu Ser Ala  
450 455 460

Ser Asp Pro Arg Gly Cys Gln Arg Cys Gln Cys Asn Ser Arg Gly Thr  
465 470 475 480

Val Pro Gly Ser Ser Pro Cys Asp Ser Ser Ser Gly Thr Cys Phe Cys  
485 490 495

Lys Arg Leu Val Thr Gly His Gly Cys Asp Arg Cys Leu Pro Gly His  
500 505 510

Trp Gly Leu Ser His Asp Leu Leu Gly Cys Arg Pro Cys Asp Cys Asp  
515 520 525

Val Gly Gly Ala Leu Asp Pro Gln Cys Asp Glu Ala Thr Gly Gln Cys  
530 535 540

Arg Cys Arg Gln His Met Ile Gly Arg Arg Cys Glu Gln Val Gln Pro  
545 550 555 560

Gly Tyr Phe Arg Pro Phe Leu Asp His Leu Thr Trp Glu Ala Glu Ala  
565 570 575

Ala Gln Gly Gln Gly Leu Glu Val Val Glu Arg Leu Val Thr Asn Arg  
580 585 590

Glu Thr Pro Ser Trp Thr Gly Pro Gly Phe Val Arg Leu Arg Glu Gly  
595 600 605

Gln Glu Val Glu Phe Leu Val Thr Ser Leu Pro Arg Ala Met Asp Tyr  
610 615 620

Asp Leu Leu Leu Arg Trp Glu Pro Gln Val Pro Glu Gln Trp Ala Glu  
625 630 635 640

Leu Glu Leu Met Val Gln Arg Pro Gly Pro Val Ser Ala His Ser Pro  
645 650 655

Cys Gly His Val Leu Pro Lys Asp Asp Arg Ile Gln Gly Met Leu His  
660 665 670

Pro Asn Thr Arg Phe Leu Val Phe Pro Arg Pro Val Cys Leu Glu Pro  
675 680 685

Gly Ile Ser Tyr Lys Leu Lys Leu Lys Leu Ile Gly Thr Gly Gly Arg  
690 695 700

Ala Gln Pro Glu Thr Ser Tyr Ser Gly Leu Leu Ile Asp Ser Leu Val  
705 710 715 720

Leu Gln Pro His Val Leu Val Leu Glu Met Phe Ser Gly Gly Asp Ala  
725 730 735

Ala Ala Leu Glu Arg Arg Thr Thr Phe Glu Arg Tyr Arg Cys His Glu

740

745

750

Glu Gly Leu Met Pro Ser Lys Ala Pro Leu Ser Glu Thr Cys Ala Pro

755

760

765

Leu Leu Ile Ser Val Ser Ala Leu Ile Tyr Asn Gly Ala Leu Pro Cys

770

775

780

Gln Cys Asp Pro Gln Gly Ser Leu Ser Ser Glu Cys Ser Pro His Gly

785

790

795

800

Gly Gln Cys Arg Cys Lys Pro Gly Val Val Gly Arg Arg Cys Asp Val

805

810

815

Cys Ala Thr Gly Tyr Tyr Gly Phe Gly Pro Ala Gly Cys Gln Ala Cys

820

825

830

Gln Cys Ser Pro Asp Gly Ala Leu Ser Ala Leu Cys Glu Gly Thr Ser

835

840

845

Gly Gln Cys Pro Cys Arg Pro Gly Ala Phe Gly Leu Arg Cys Asp His

850

855

860

Cys Gln Arg Gly Gln Trp Gly Phe Pro Asn Cys Arg Pro Cys Val Cys  
865 870 875 880

Asn Gly Arg Ala Asp Glu Cys Asp Thr His Thr Gly Ala Cys Leu Gly  
885 890 895

Cys Arg Asp Tyr Thr Gly Gly Glu His Cys Glu Arg Cys Ile Ala Gly  
900 905 910

Phe His Gly Asp Pro Arg Leu Pro Tyr Gly Gly Gln Cys Arg Pro Cys  
915 920 925

Pro Cys Pro Glu Gly Pro Gly Ser Gln Arg His Phe Ala Thr Ser Cys  
930 935 940

His Arg Asp Gly Tyr Ser Gln Gln Ile Val Cys Gln Cys Arg Glu Gly  
945 950 955 960

Tyr Thr Gly Leu Arg Cys Glu Ala Cys Ala Pro Gly His Phe Gly Asp  
965 970 975

Pro Ser Lys Pro Gly Gly Arg Cys Gln Leu Cys Glu Cys Ser Gly Asn  
980 985 990

Ile Asp Pro Met Asp Pro Asp Ala Cys Asp Pro His Thr Gly Gln Cys  
995 1000 1005

Leu Arg Cys Leu His Asn Thr Glu Gly Pro His Cys Gly Tyr Cys  
1010 1015 1020

Lys Pro Gly Phe His Gly Gln Ala Ala Arg Gln Ser Cys His Arg  
1025 1030 1035

Cys Thr Cys Asn Leu Leu Gly Thr Asp Pro Arg Arg Cys Pro Ser  
1040 1045 1050

Thr Asp Leu Cys His Cys Asp Pro Ser Thr Gly Gln Cys Pro Cys  
1055 1060 1065

Leu Pro His Val Gln Gly Leu Asn Cys Asp His Cys Ala Pro Asn  
1070 1075 1080



Phe Trp Asn Phe Thr Ser Gly Arg Gly Cys Gln Pro Cys Ala Cys  
1085 1090 1095

His Pro Ser Arg Ala Arg Gly Pro Thr Cys Asn Glu Phe Thr Gly  
1100 1105 1110

Gln Cys His Cys His Ala Gly Phe Gly Gly Arg Thr Cys Ser Glu  
1115 1120 1125

Cys Gln Glu Leu Tyr Trp Gly Asp Pro Gly Leu Gln Cys Arg Ala  
1130 1135 1140

Cys Asp Cys Asp Pro Arg Gly Ile Asp Lys Pro Gln Cys His Arg  
1145 1150 1155

Ser Thr Gly His Cys Ser Cys Arg Pro Gly Val Ser Gly Val Arg  
1160 1165 1170

Cys Asp Gln Cys Ala Arg Gly Phe Ser Gly Val Phe Pro Ala Cys  
1175 1180 1185

His Pro Cys His Ala Cys Phe Gly Asp Trp Asp Arg Val Val Gln  
1190 1195 1200

Asp Leu Ala Ala Arg Thr Arg Arg Leu Glu Gln Trp Ala Gln Glu  
1205 1210 1215

Leu Gln Gln Thr Gly Val Leu Gly Ala Phe Glu Ser Ser Phe Leu  
1220 1225 1230

Asn Met Gln Gly Lys Leu Gly Met Val Gln Ala Ile Met Ser Ala  
1235 1240 1245

Arg Asn Ala Ser Ala Ala Ser Thr Ala Lys Leu Val Glu Ala Thr  
1250 1255 1260

Glu Gly Leu Arg His Glu Ile Gly Lys Thr Thr Glu Arg Leu Thr  
1265 1270 1275

Gln Leu Glu Ala Glu Leu Thr Ala Val Gln Asp Glu Asn Phe Asn  
1280 1285 1290

Ala Asn His Ala Leu Ser Gly Leu Glu Arg Asp Gly Leu Ala Leu

1295

1300

1305

Asn Leu Thr Leu Arg Gln Leu Asp Gln His Leu Glu Ile Leu Lys

1310

1315

1320

His Ser Asn Phe Leu Gly Ala Tyr Asp Ser Ile Arg His Ala His

1325

1330

1335

Ser Gln Ser Thr Glu Ala Glu Arg Arg Ala Asn Ala Ser Thr Phe

1340

1345

1350

Ala Val Pro Ser Pro Val Ser Asn Ser Ala Asp Thr Arg Arg Arg

1355

1360

1365

Thr Glu Val Leu Met Gly Ala Gln Lys Glu Asn Phe Asn Arg Gln

1370

1375

1380

His Leu Ala Asn Gln Gln Ala Leu Gly Arg Leu Ser Ala His Ala

1385

1390

1395

His Thr Leu Ser Leu Thr Gly Ile Asn Glu Leu Val Cys Gly Ala

1400

1405

1410

Pro Gly Asp Ala Pro Cys Ala Thr Ser Pro Cys Gly Gly Ala Gly  
1415 1420 1425

Cys Arg Asp Glu Asp Gly Gln Pro Arg Cys Gly Gly Leu Gly Cys  
1430 1435 1440

Ser Gly Ala Ala Ala Thr Ala Asp Leu Ala Leu Gly Arg Ala Arg  
1445 1450 1455

His Thr Gln Ala Glu Leu Gln Arg Ala Leu Val Glu Gly Gly Gly  
1460 1465 1470

Ile Leu Ser Arg Val Ser Glu Thr Arg Arg Gln Ala Glu Glu Ala  
1475 1480 1485

Gln Gln Arg Ala Gln Ala Ala Leu Asp Lys Ala Asn Ala Ser Arg  
1490 1495 1500

Gly Gln Val Glu Gln Ala Asn Gln Glu Leu Arg Glu Leu Ile Gln  
1505 1510 1515

Asn Val Lys Asp Phe Leu Ser Gln Glu Gly Ala Asp Pro Asp Ser  
1520 1525 1530

Ile Glu Met Val Ala Thr Arg Val Leu Asp Ile Ser Ile Pro Ala  
1535 1540 1545

Ser Pro Glu Gln Ile Gln Arg Leu Ala Ser Glu Ile Ala Glu Arg  
1550 1555 1560

Val Arg Ser Leu Ala Asp Val Asp Thr Ile Leu Ala His Thr Met  
1565 1570 1575

Gly Asp Val Arg Arg Ala Glu Gln Leu Leu Gln Asp Ala His Arg  
1580 1585 1590

Ala Arg Ser Arg Ala Glu Gly Glu Arg Gln Lys Ala Glu Thr Val  
1595 1600 1605

Gln Ala Ala Leu Glu Glu Ala Gln Arg Ala Gln Gly Ala Ala Gln  
1610 1615 1620

Gly Ala Ile Trp Gly Ala Val Val Asp Thr Gln Asn Thr Glu Gln  
1625 1630 1635

Thr Leu Gln Arg Val Gln Glu Arg Met Ala Gly Ala Glu Lys Ser  
1640 1645 1650

Leu Asn Ser Ala Gly Glu Arg Ala Arg Gln Leu Asp Ala Leu Leu  
1655 1660 1665

Glu Ala Leu Lys Leu Lys Arg Ala Gly Asn Ser Leu Ala Ala Ser  
1670 1675 1680

Thr Ala Glu Glu Thr Ala Gly Ser Ala Gln Ser Arg Ala Arg Glu  
1685 1690 1695

Ala Glu Lys Gln Leu Arg Glu Gln Val Gly Asp Gln Tyr Gln Thr  
1700 1705 1710

Val Arg Ala Leu Ala Glu Arg Lys Ala Glu Gly Val Leu Ala Ala  
1715 1720 1725

Gln Ala Arg Ala Glu Gln Leu Arg Asp Glu Ala Arg Asp Leu Leu

1730

1735

1740

Gln Ala Ala Gln Asp Lys Leu Gln Arg Leu Gln Glu Leu Glu Gly

1745

1750

1755

Thr Tyr Glu Glu Asn Glu Arg Ala Leu Glu Gly Lys Ala Ala Gln

1760

1765

1770

Leu Asp Gly Leu Glu Ala Arg Met Arg Ser Val Leu Gln Ala Ile

1775

1780

1785

Asn Leu Gln Val Gln Ile Tyr Asn Thr Cys Gln

1790

1795

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 5153

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1476)

&lt;223&gt; laminin 12 gamma 3 chain

&lt;400&gt; 9

atg gct gta tcc agg gtc ctg tcc ctc ctg gca acg gtg gca tcg atg 48

Met Ala Val Ser Arg Val Leu Ser Leu Leu Ala Thr Val Ala Ser Met

1 5 10 15

gcg ctg gtg att cag gag aca cac ttc gcg gca ggc gcg gac atg ggc 96

Ala Leu Val Ile Gln Glu Thr His Phe Ala Ala Gly Ala Asp Met Gly

20 25 30

tct tgc tac gac ggt gtg gga cgc gca cag cgc tgt ctg cct gag ttc 144

Ser Cys Tyr Asp Gly Val Gly Arg Ala Gln Arg Cys Leu Pro Glu Phe

35 40 45

gag aac gcg gcg ttc ggc cga cgc gcc gag gcc tcc cac acg tgc gga 192

Glu Asn Ala Ala Phe Gly Arg Arg Ala Glu Ala Ser His Thr Cys Gly

50 55 60

cgg ccc ccg gag gac ttc tgt cca cac gtg ggg gca cca ggg gct ggg 240

Arg Pro Pro Glu Asp Phe Cys Pro His Val Gly Ala Pro Gly Ala Gly

65 70 75 80

cta cag tgc cag cgc tgc gac gat gct gac ccc gga cga cgc cac gac 288

Leu Gln Cys Gln Arg Cys Asp Asp Ala Asp Pro Gly Arg Arg His Asp

85 90 95

gcc tcc tac ctc aca gac ttc cac agc ccc gat gac agc acc tgg tgg 336

Ala Ser Tyr Leu Thr Asp Phe His Ser Pro Asp Asp Ser Thr Trp Trp

100 105 110



cag agc cca tcc atg gcc ttc ggg gtg cag tac ccc acc tcg gtt aac 384  
Gln Ser Pro Ser Met Ala Phe Gly Val Gln Tyr Pro Thr Ser Val Asn  
115 120 125

ctg acc ttg agc tta ggg aag gcc tat gag att acc tat gtg agg ctg 432  
Leu Thr Leu Ser Leu Gly Lys Ala Tyr Glu Ile Thr Tyr Val Arg Leu  
130 135 140

aag ttc cac acc agt cgc cct gag agt ttt gcc atc tac aag cgc acg 480  
Lys Phe His Thr Ser Arg Pro Glu Ser Phe Ala Ile Tyr Lys Arg Thr  
145 150 155 160

tac gcc agt ggc ccc tgg gag ccc tac caa tac tac agt gcc tcc tgc 528  
Tyr Ala Ser Gly Pro Trp Glu Pro Tyr Gln Tyr Tyr Ser Ala Ser Cys  
165 170 175

cag aaa acc tat ggc cgt cct gag ggc cac tac ctg cga ccg ggc gag 576  
Gln Lys Thr Tyr Gly Arg Pro Glu Gly His Tyr Leu Arg Pro Gly Glu  
180 185 190

gat gag agg gtg gcc ttc tgc acc tct gag ttc agt gac atc tcc ccc 624  
Asp Glu Arg Val Ala Phe Cys Thr Ser Glu Phe Ser Asp Ile Ser Pro  
195 200 205

ttg aac ggg ggc aac gtg gcc ttc tcc acc ctg gaa ggc cgt ccc agt 672  
Leu Asn Gly Gly Asn Val Ala Phe Ser Thr Leu Glu Gly Arg Pro Ser  
210 215 220

gcc tac aac ttt gag gag agc cct gtg ctg cag gag tgg gtc acc agc 720  
Ala Tyr Asn Phe Glu Glu Ser Pro Val Leu Gln Glu Trp Val Thr Ser  
225 230 235 240

act gac atc ctg atc tct cta gat cgg ctc aac acg ttt ggg gat gac 768  
Thr Asp Ile Leu Ile Ser Leu Asp Arg Leu Asn Thr Phe Gly Asp Asp  
245 250 255

atc ttc aag gac ccc aga gtg ctc cag tct tac tac tac gct gtg tct 816  
Ile Phe Lys Asp Pro Arg Val Leu Gln Ser Tyr Tyr Tyr Ala Val Ser  
260 265 270

gac ttc tct gtg ggt ggc agg tgc aaa tgc aat ggt cac gcc agt gaa 864  
Asp Phe Ser Val Gly Gly Arg Cys Lys Cys Asn Gly His Ala Ser Glu  
275 280 285

tgc gaa ccc aat gcg gct ggt cag ctg gct tgc cgc tgt cag cac aac 912  
Cys Glu Pro Asn Ala Ala Gly Gln Leu Ala Cys Arg Cys Gln His Asn  
290 295 300

acc aca gga gtg gac tgc gag cgt tgt ctg ccc ttc ttc cag gac cgt 960  
Thr Thr Gly Val Asp Cys Glu Arg Cys Leu Pro Phe Phe Gln Asp Arg  
305 310 315 320

ccg tgg gcc cga ggc acc gcc gag gat gcc aac gag tgt ctg ccc tgc 1008  
Pro Trp Ala Arg Gly Thr Ala Glu Asp Ala Asn Glu Cys Leu Pro Cys  
325 330 335

aac tgc agt ggg cac tct gag gag tgc acg ttt gac agg gag ctc tat 1056

Asn Cys Ser Gly His Ser Glu Glu Cys Thr Phe Asp Arg Glu Leu Tyr  
 340 345 350

cgg agc aca ggc cat ggt ggg cac tgt cag cgg tgc cgt gac cac aca 1104  
 Arg Ser Thr Gly His Gly Gly His Cys Gln Arg Cys Arg Asp His Thr  
 355 360 365

act ggg cca cac tgt gag cgc tgt gag aag aac tac tac aga tgg tcc 1152  
 Thr Gly Pro His Cys Glu Arg Cys Glu Lys Asn Tyr Tyr Arg Trp Ser  
 370 375 380

ccg aag aca cca tgc caa ccc tgt gac tgc cac cca gca ggc tct ctg 1200  
 Pro Lys Thr Pro Cys Gln Pro Cys Asp Cys His Pro Ala Gly Ser Leu  
 385 390 395 400

agt ctc cag tgt gac aac tca ggc gtc tgt ccc tgc aag ccc aca gtg 1248  
 Ser Leu Gln Cys Asp Asn Ser Gly Val Cys Pro Cys Lys Pro Thr Val  
 405 410 415

act ggc tgg aag tgt gac cgc tgc ctg cct gga ttc cac tca ctc agt 1296  
 Thr Gly Trp Lys Cys Asp Arg Cys Leu Pro Gly Phe His Ser Leu Ser  
 420 425 430

gag ggc ggc tgc aga ccc tgt gcc tgc aat gtc gcc ggc agc ttg ggc 1344  
 Glu Gly Gly Cys Arg Pro Cys Ala Cys Asn Val Ala Gly Ser Leu Gly  
 435 440 445

acc tgt gac ccc cgc agt ggg aac tgt ccc tgc aaa gag aat gta gaa 1392

Thr Cys Asp Pro Arg Ser Gly Asn Cys Pro Cys Lys Glu Asn Val Glu

450

455

460

ggc agc ctg tgt gac aga tgc cgc cct ggg aca ttt aac ctg cag ccc 1440

Gly Ser Leu Cys Asp Arg Cys Arg Pro Gly Thr Phe Asn Leu Gln Pro

465

470

475

480

cac aat cca gtg ggc tgc agc agc tgc ttc tgt tat ggccactcca 1486

His Asn Pro Val Gly Cys Ser Ser Cys Phe Cys Tyr

485

490

aggtgtgttc tcctgctgcc gggttccagg aacaccacat ccgctcagac ttccgccatg 1546

gagctggtgg ctggcagatc agaagcatgg gagtgtccaa gcgtcctctg caatggagcc 1606

agagtgggct cctcctgggc ctgcgaggag gggaggaact ctcagcccca aagaagtcc 1666

tgggagacca gagactcagc tatggacagc cagtcatact gaccctccaa gtaccccctg 1726

gaggctcccc acctcctatt cagctgagac tggagggagc aggcttggct ctgtctctga 1786

ggccctccag tctaccagc cctcaggaca ccaggcagcc aagacgagtt cagctccagt 1846

tcctcttgca ggagacttct gaggaggcag agtccccact gccaccttc cacttccagc 1906

gcctgctttc caatctgact gctctgagca tctggaccag tggccaagga ccgggccatt 1966

ctggccaagt gctcttgtgt gaagttcagc tcacatcggc ctggccccag cgtgagcttg 2026

ccccccagc ctcttggtg gagacctgt tatgtcccca gggatacaca ggccagttct 2086

gtgaattctg tgctctggga tacaagagag aaatacctca tgggggtccc tatgccaact 2146

gcattccctg cacctgcaac cagcatggca cctgtgaccc caacacaggg atctgcctgt 2206

gtggccacca caccgagggt ccatcctgtg agcgggtgcat gccaggtttc tacggtaacg 2266

ccttctcagg ccgtgctgat gattgccagc cctgtccgtg ccctggccaa tcagcctgtg 2326

caaccatccc agagagtgga gatgtggtgt gcacacactg ccctcctggt cagagaggac 2386

gacgatgcga gagctgcga gatggctttt ttggggatcc tctagggtc tctggagctc 2446

cccagccctg ccgccgatgc cagtgcagcg ggaacgtgga tctcaatgct gtgggcaact 2506

gtgatcctca ttctggccac tgcttgcgt gtctgtacaa cacgacaggg gccactgcg 2566

agcactgtcg ggagggtttc tacgggagtg ccgtggccac aaggcccgtg gacaaatgtg 2626

ctccctgcag ctgtgacctg aggggctcag tcagtgagaa gacctgcaac cctgtgactg 2686

gccagtgtgt ctgcctgcct tatgtctccg ggagggactg cagccgtgc agccctggct 2746

tctatgacct ccagtctggg aggggctgcc agagctgcaa atgtcaccca cttggatcct 2806

tggagaataa gtgccacccc aagactggcc agtgtccctg ccgacctggt gtcactggcc 2866

aagcctgtga cagatgccag ctaggtttct ttggcttctc catcaagggc tgccgagact 2926

gtaggtgctc cccattgggt gctgcctcat ctgagtcca tgagaacagc acctgtgtgt 2986

gccggcccg ctttgtgggc tataaatgcg accgctgcca ggacaatttc ttcctgcgg 3046

atggcgacac aggctgcca gagtgtcca ctgctatgc cctagtgaag gaagaggcag 3106

ccaagctgaa ggccaggttg atgctgatgg aggggtggct tcaaaggtct gactgtgta 3166

gcccctgggg accactagac attctgcagg gagaagcccc tctgggggat gtctaccaag 3226

gtcaccacct acttcaagag acccggggga ctttctgca gcagatggtg ggcctggagg 3286

attctgtgaa ggccacttgg gagcagttgc aggtgctgag agggcatgta cactgtgccc 3346

aggctggagc tcagaagacc tgcatccagc tggcagagct ggaggagaca ttgcagtcct 3406

cagaggagga ggtccttcgt gcagcctcag ctctctcatt tctggcaagt cttcagaaag 3466

gatccagcac accaccaat tggagtcacc tggcatcaga ggcccagatc ctgcccagaa 3526

gccacaggga cacggccacc aagatcgaag ctacctgga aagggccctg ctgcctcca 3586

acgccagcta tgagctcctg aagctgatgg aaggcagagt ggcctcggaa gccagcagg 3646

aactggagga caggtaccag gaggtgcagg cagctcagac tgccctgggc atagctgtgg 3706

cagaggcgct gcccaaagct gaaaaggcac tggccacggt gaagcaagtc attggtgacg 3766

cagccccaca tctaggcttg ctggtcaccc ctgaagcaat gaacttccaa gccaggggcc 3826

tgagctggaa agtgaaggcc ctggagcaga agctggagca gaaggagccc gaggtgggcc 3886

agtctgtggg agccctgcag gtggaggctg gaagagcctt ggagaagatg gagcccttta 3946

tgcagctacg caataagacc acagctgcct tcacacgggc ttctcagct gtgcaagctg 4006

ccaaggtgac cgtcatagga gcagagaccc tgctagctga cctagaggga atgaagctga 4066

ggtctcctct acccaaggag caggcagcgc tgaagaagaa agcaggcagc atcaggacca 4126

ggctcctgga ggacacaaag aggaagacca agcatgcaga gaggatgctg ggaaatgctg 4186

cctctctctc ctccagcacc aagaagaaaa gcaaagaagc agaactgatg tctaaggaca 4246

atgccaagct ctccagagct ttgctgaggg aaggcaagca gggctaccgt catgccagcc 4306

gactcgccag ccagacccag gccacactcc gtcgggcctc tcgcctgctg ctgacctcag 4366

aagcacacaa gcaggagctg gaggaagcta aacaggtgac ctctgggctg agcactgtgg 4426

agcgccaggt ccgagagtct cggatctcct tggagaagga caccaaggct ctgtcagagc 4486

tgcttgtgaa gctgggggtcc ctgggtgtcc accaagcccc tgctcagacc ctgaacgaga 4546

cccagcgggc actagaaagc ttgaggctgc agctggattc ccacggagcc ctgcatcaca 4606

aactgaggca gctggaggaa gagtctgctc gacaggagct gcagattcag agctttgagg 4666

acgaccttgc tgagatccgc gctgacaagc acaacttggg gaccattctg agcagtctgc 4726  
cagagaactg tgccagctag accctgggtac accctcccca cctgcccgtt tcctgtccac 4786  
tccctgtagg tgtcccaggt ctgcctgtcg tatgttcacg tgaatgcttg tttgctgggt 4846  
catcttcggt ctgagcagga gtgaatacat gctcacacct ccacagatga ccctgtatgt 4906  
agtcctcagt gtgtactctc taaacgtgca tcagcataca caccaccagta tttgcacata 4966  
tgtgtatgtg atgcactgat gtgttaagac cacctgtgtg catgcacaca tatgagagtc 5026  
tagagctgtg gagagcagtc ctgagcttgg cacatccaca ttctgggtggg ttcctgctat 5086  
gaatatacctg caggatgaca catctacacc tcctcagaat cagggccaac aggtgtactc 5146  
gagctga 5153

<210> 10

<211> 492

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Met Ala Val Ser Arg Val Leu Ser Leu Leu Ala Thr Val Ala Ser Met

1

5

10

15



Ala Leu Val Ile Gln Glu Thr His Phe Ala Ala Gly Ala Asp Met Gly  
20 25 30

Ser Cys Tyr Asp Gly Val Gly Arg Ala Gln Arg Cys Leu Pro Glu Phe  
35 40 45

Glu Asn Ala Ala Phe Gly Arg Arg Ala Glu Ala Ser His Thr Cys Gly  
50 55 60

Arg Pro Pro Glu Asp Phe Cys Pro His Val Gly Ala Pro Gly Ala Gly  
65 70 75 80

Leu Gln Cys Gln Arg Cys Asp Asp Ala Asp Pro Gly Arg Arg His Asp  
85 90 95

Ala Ser Tyr Leu Thr Asp Phe His Ser Pro Asp Asp Ser Thr Trp Trp  
100 105 110

Gln Ser Pro Ser Met Ala Phe Gly Val Gln Tyr Pro Thr Ser Val Asn  
115 120 125

Leu Thr Leu Ser Leu Gly Lys Ala Tyr Glu Ile Thr Tyr Val Arg Leu  
130 135 140

Lys Phe His Thr Ser Arg Pro Glu Ser Phe Ala Ile Tyr Lys Arg Thr  
145 150 155 160

Tyr Ala Ser Gly Pro Trp Glu Pro Tyr Gln Tyr Tyr Ser Ala Ser Cys  
165 170 175

Gln Lys Thr Tyr Gly Arg Pro Glu Gly His Tyr Leu Arg Pro Gly Glu  
180 185 190

Asp Glu Arg Val Ala Phe Cys Thr Ser Glu Phe Ser Asp Ile Ser Pro  
195 200 205

Leu Asn Gly Gly Asn Val Ala Phe Ser Thr Leu Glu Gly Arg Pro Ser  
210 215 220

Ala Tyr Asn Phe Glu Glu Ser Pro Val Leu Gln Glu Trp Val Thr Ser  
225 230 235 240

Thr Asp Ile Leu Ile Ser Leu Asp Arg Leu Asn Thr Phe Gly Asp Asp  
245 250 255

Ile Phe Lys Asp Pro Arg Val Leu Gln Ser Tyr Tyr Tyr Ala Val Ser  
260 265 270

Asp Phe Ser Val Gly Gly Arg Cys Lys Cys Asn Gly His Ala Ser Glu  
275 280 285

Cys Glu Pro Asn Ala Ala Gly Gln Leu Ala Cys Arg Cys Gln His Asn  
290 295 300

Thr Thr Gly Val Asp Cys Glu Arg Cys Leu Pro Phe Phe Gln Asp Arg  
305 310 315 320

Pro Trp Ala Arg Gly Thr Ala Glu Asp Ala Asn Glu Cys Leu Pro Cys  
325 330 335

Asn Cys Ser Gly His Ser Glu Glu Cys Thr Phe Asp Arg Glu Leu Tyr  
340 345 350

Arg Ser Thr Gly His Gly Gly His Cys Gln Arg Cys Arg Asp His Thr

355

360

365

Thr Gly Pro His Cys Glu Arg Cys Glu Lys Asn Tyr Tyr Arg Trp Ser

370

375

380

Pro Lys Thr Pro Cys Gln Pro Cys Asp Cys His Pro Ala Gly Ser Leu

385

390

395

400

Ser Leu Gln Cys Asp Asn Ser Gly Val Cys Pro Cys Lys Pro Thr Val

405

410

415

Thr Gly Trp Lys Cys Asp Arg Cys Leu Pro Gly Phe His Ser Leu Ser

420

425

430

Glu Gly Gly Cys Arg Pro Cys Ala Cys Asn Val Ala Gly Ser Leu Gly

435

440

445

Thr Cys Asp Pro Arg Ser Gly Asn Cys Pro Cys Lys Glu Asn Val Glu

450

455

460

Gly Ser Leu Cys Asp Arg Cys Arg Pro Gly Thr Phe Asn Leu Gln Pro

465

470

475

480

His Asn Pro Val Gly Cys Ser Ser Cys Phe Cys Tyr

485

490

<210> 11

<211> 2265

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 11

Gln Ala Gln Gln Ile Val Gln Pro Gln Ser Pro Leu Thr Val Ser Gln

1

5

10

15

Ser Lys Pro Gly Cys Tyr Asp Asn Gly Lys His Tyr Gln Ile Asn Gln

20

25

30

Gln Trp Glu Arg Thr Tyr Leu Gly Ser Ala Leu Val Cys Thr Cys Tyr

35

40

45

Gly Gly Ser Arg Gly Phe Asn Cys Glu Ser Lys Pro Glu Pro Glu Glu

50

55

60

Thr Cys Phe Asp Lys Tyr Thr Gly Asn Thr Tyr Arg Val Gly Asp Thr  
65 70 75 80

Tyr Glu Arg Pro Lys Asp Ser Met Ile Trp Asp Cys Thr Cys Ile Gly  
85 90 95

Ala Gly Arg Gly Arg Ile Ser Cys Thr Ile Ala Asn Arg Cys His Glu  
100 105 110

Gly Gly Gln Ser Tyr Lys Ile Gly Asp Thr Trp Arg Arg Pro His Glu  
115 120 125

Thr Gly Gly Tyr Met Leu Glu Cys Val Cys Leu Gly Asn Gly Lys Gly  
130 135 140

Glu Trp Thr Cys Lys Pro Ile Ala Glu Lys Cys Phe Asp Gln Ala Ala  
145 150 155 160

Gly Thr Ser Tyr Val Val Gly Glu Thr Trp Glu Lys Pro Tyr Gln Gly  
165 170 175

Trp Met Met Val Asp Cys Thr Cys Leu Gly Glu Gly Ser Gly Arg Ile

180

185

190

Thr Cys Thr Ser Arg Asn Arg Cys Asn Asp Gln Asp Thr Arg Thr Ser

195

200

205

Tyr Arg Ile Gly Asp Thr Trp Ser Lys Lys Asp Asn Arg Gly Asn Leu

210

215

220

Leu Gln Cys Ile Cys Thr Gly Asn Gly Arg Gly Glu Trp Lys Cys Glu

225

230

235

240

Arg His Thr Ser Leu Gln Thr Thr Ser Ala Gly Ser Gly Ser Phe Thr

245

250

255

Asp Val Arg Thr Ala Ile Tyr Gln Pro Gln Pro His Pro Gln Pro Pro

260

265

270

Pro Tyr Gly His Cys Val Thr Asp Ser Gly Val Val Tyr Ser Val Gly

275

280

285

Met Gln Trp Leu Lys Thr Gln Gly Asn Lys Gln Met Leu Cys Thr Cys

290

295

300

Leu Gly Asn Gly Val Ser Cys Gln Glu Thr Ala Val Thr Gln Thr Tyr  
305 310 315 320

Gly Gly Asn Ser Asn Gly Glu Pro Cys Val Leu Pro Phe Thr Tyr Asn  
325 330 335

Gly Lys Thr Phe Tyr Ser Cys Thr Thr Glu Gly Arg Gln Asp Gly His  
340 345 350

Leu Trp Cys Ser Thr Thr Ser Asn Tyr Glu Gln Asp Gln Lys Tyr Ser  
355 360 365

Phe Cys Thr Asp His Thr Val Leu Val Gln Thr Arg Gly Gly Asn Ser  
370 375 380

Asn Gly Ala Leu Cys His Phe Pro Phe Leu Tyr Asn Asn His Asn Tyr  
385 390 395 400

Thr Asp Cys Thr Ser Glu Gly Arg Arg Asp Asn Met Lys Trp Cys Gly  
405 410 415



Thr Thr Gln Asn Tyr Asp Ala Asp Gln Lys Phe Gly Phe Cys Pro Met  
420 425 430

Ala Ala His Glu Glu Ile Cys Thr Thr Asn Glu Gly Val Met Tyr Arg  
435 440 445

Ile Gly Asp Gln Trp Asp Lys Gln His Asp Met Gly His Met Met Arg  
450 455 460

Cys Thr Cys Val Gly Asn Gly Arg Gly Glu Trp Thr Cys Val Ala Tyr  
465 470 475 480

Ser Gln Leu Arg Asp Gln Cys Ile Val Asp Gly Ile Thr Tyr Asn Val  
485 490 495

Asn Asp Thr Phe His Lys Arg His Glu Glu Gly His Met Leu Asn Cys  
500 505 510

Thr Cys Phe Gly Gln Gly Arg Gly Arg Trp Lys Cys Asp Pro Val Asp  
515 520 525

Gln Cys Gln Asp Ser Glu Thr Arg Thr Phe Tyr Gln Ile Gly Asp Ser  
530 535 540

Trp Glu Lys Tyr Leu Gln Gly Val Arg Tyr Gln Cys Tyr Cys Tyr Gly  
545 550 555 560

Arg Gly Ile Gly Glu Trp Ala Cys Gln Pro Leu Gln Thr Tyr Pro Asp  
565 570 575

Thr Ser Gly Pro Val Gln Val Ile Ile Thr Glu Thr Pro Ser Gln Pro  
580 585 590

Asn Ser His Pro Ile Gln Trp Ser Ala Pro Glu Ser Ser His Ile Ser  
595 600 605

Lys Tyr Ile Leu Arg Trp Lys Pro Lys Asn Ser Pro Asp Arg Trp Lys  
610 615 620

Glu Ala Thr Ile Pro Gly His Leu Asn Ser Tyr Thr Ile Lys Gly Leu  
625 630 635 640

Arg Pro Gly Val Val Tyr Glu Gly Gln Leu Ile Ser Val Gln His Tyr

645

650

655

Gly Gln Arg Glu Val Thr Arg Phe Asp Phe Thr Thr Thr Ser Thr Ser

660

665

670

Pro Ala Val Thr Ser Asn Thr Val Thr Gly Glu Thr Thr Pro Leu Ser

675

680

685

Pro Val Val Ala Thr Ser Glu Ser Val Thr Glu Ile Thr Ala Ser Ser

690

695

700

Phe Val Val Ser Trp Val Ser Ala Ser Asp Thr Val Ser Gly Phe Arg

705

710

715

720

Val Glu Tyr Glu Leu Ser Glu Glu Gly Asp Glu Pro Gln Tyr Leu Asp

725

730

735

Leu Pro Ser Thr Ala Thr Ser Val Asn Ile Pro Asp Leu Leu Pro Gly

740

745

750

Arg Lys Tyr Thr Val Asn Val Tyr Glu Ile Ser Glu Glu Gly Glu Gln

755

760

765

Asn Leu Ile Leu Ser Thr Ser Gln Thr Thr Ala Pro Asp Ala Pro Pro  
770 775 780

Asp Pro Thr Val Asp Gln Val Asp Asp Thr Ser Ile Val Val Arg Trp  
785 790 795 800

Ser Arg Pro Arg Ala Pro Ile Thr Gly Tyr Arg Ile Val Tyr Ser Pro  
805 810 815

Ser Val Glu Gly Ser Ser Thr Glu Leu Asn Leu Pro Glu Thr Ala Asn  
820 825 830

Ser Val Thr Leu Ser Asp Leu Gln Pro Gly Val Gln Tyr Asn Ile Thr  
835 840 845

Ile Tyr Ala Val Glu Glu Asn Gln Glu Ser Thr Pro Val Phe Ile Gln  
850 855 860

Gln Glu Thr Thr Gly Val Pro Arg Ser Asp Lys Val Pro Pro Pro Arg  
865 870 875 880

Asp Leu Gln Phe Val Glu Val Thr Asp Val Lys Ile Thr Ile Met Trp  
885 890 895

Thr Pro Pro Glu Ser Pro Val Thr Gly Tyr Arg Val Asp Val Ile Pro  
900 905 910

Val Asn Leu Pro Gly Glu His Gly Gln Arg Leu Pro Val Ser Arg Asn  
915 920 925

Thr Phe Ala Glu Val Thr Gly Leu Ser Pro Gly Val Thr Tyr His Phe  
930 935 940

Lys Val Phe Ala Val Asn Gln Gly Arg Glu Ser Lys Pro Leu Thr Ala  
945 950 955 960

Gln Gln Ala Thr Lys Leu Asp Ala Pro Thr Asn Leu Gln Phe Ile Asn  
965 970 975

Glu Thr Asp Thr Thr Val Ile Val Thr Trp Thr Pro Pro Arg Ala Arg  
980 985 990

Ile Val Gly Tyr Arg Leu Thr Val Gly Leu Thr Arg Gly Gly Gln Pro  
995 1000 1005

Lys Gln Tyr Asn Val Gly Pro Ala Ala Ser Gln Tyr Pro Leu Arg  
1010 1015 1020

Asn Leu Gln Pro Gly Ser Glu Tyr Ala Val Ser Leu Val Ala Val  
1025 1030 1035

Lys Gly Asn Gln Gln Ser Pro Arg Val Thr Gly Val Phe Thr Thr  
1040 1045 1050

Leu Gln Pro Leu Gly Ser Ile Pro His Tyr Asn Thr Glu Val Thr  
1055 1060 1065

Glu Thr Thr Ile Val Ile Thr Trp Thr Pro Ala Pro Arg Ile Gly  
1070 1075 1080

Phe Lys Leu Gly Val Arg Pro Ser Gln Gly Gly Glu Ala Pro Arg  
1085 1090 1095

Glu Val Thr Ser Glu Ser Gly Ser Ile Val Val Ser Gly Leu Thr

1100

1105

1110

Pro Gly Val Glu Tyr Val Tyr Thr Ile Ser Val Leu Arg Asp Gly

1115

1120

1125

Gln Glu Arg Asp Ala Pro Ile Val Lys Lys Val Val Thr Pro Leu

1130

1135

1140

Ser Pro Pro Thr Asn Leu His Leu Glu Ala Asn Pro Asp Thr Gly

1145

1150

1155

Val Leu Thr Val Ser Trp Glu Arg Ser Thr Thr Pro Asp Ile Thr

1160

1165

1170

Gly Tyr Arg Ile Thr Thr Thr Pro Thr Asn Gly Gln Gln Gly Tyr

1175

1180

1185

Ser Leu Glu Glu Val Val His Ala Asp Gln Ser Ser Cys Thr Phe

1190

1195

1200

Glu Asn Leu Ser Pro Gly Leu Glu Tyr Asn Val Ser Val Tyr Thr

1205

1210

1215

Val Lys Asp Asp Lys Glu Ser Val Pro Ile Ser Asp Thr Ile Ile  
1220 1225 1230

Pro Ala Val Pro Pro Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Val Gly  
1235 1240 1245

Pro Asp Thr Met Arg Val Thr Trp Ala Pro Pro Ser Ser Ile Glu  
1250 1255 1260

Leu Thr Asn Leu Leu Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu  
1265 1270 1275

Asp Val Ala Glu Leu Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val  
1280 1285 1290

Leu Thr Asn Leu Leu Pro Gly Thr Glu Tyr Leu Val Ser Val Ser  
1295 1300 1305

Ser Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Ile Pro Leu Arg Gly Arg Gln  
1310 1315 1320



Lys Thr Ala Leu Asp Ser Pro Ser Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile  
 1325 1330 1335

Thr Ala Asn Ser Phe Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr  
 1340 1345 1350

Ile Thr Gly Tyr Arg Ile Arg His His Pro Glu Asn Met Gly Gly  
 1355 1360 1365

Arg Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro Pro Ser Arg Asn Ser Ile Thr  
 1370 1375 1380

Leu Thr Asn Leu Asn Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val  
 1385 1390 1395

Ala Leu Asn Ser Lys Glu Glu Ser Leu Pro Leu Val Gly Gln Gln  
 1400 1405 1410

Ser Thr Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Ile Ala Ala

1415

1420

1425

Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr

1430

1435

1440

Val Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Ser Ser

1445

1450

1455

Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr

1460

1465

1470

Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr

1475

1480

1485

Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Val

1490

1495

1500

Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu Ile Asp Lys Pro Ser Gln Met Gln

1505

1510

1515

Val Thr Asp Val Gln Asp Asn Ser Ile Ser Val Arg Trp Leu Pro

1520

1525

1530

Ser Ser Ser Pro Val Thr Gly Tyr Arg Val Thr Thr Ala Pro Lys  
1535 1540 1545

Asn Gly Pro Gly Pro Ser Lys Thr Lys Thr Val Gly Pro Asp Gln  
1550 1555 1560

Thr Glu Met Thr Ile Glu Gly Leu Gln Pro Thr Val Glu Tyr Val  
1565 1570 1575

Val Ser Val Tyr Ala Gln Asn Gln Asn Gly Glu Ser Gln Pro Leu  
1580 1585 1590

Val Gln Thr Ala Val Thr Thr Ile Pro Ala Pro Thr Asn Leu Lys  
1595 1600 1605

Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Thr Ala Gln Trp Thr Ala  
1610 1615 1620

Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys  
1625 1630 1635

Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser  
1640 1645 1650

Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu  
1655 1660 1665

Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala  
1670 1675 1680

Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg  
1685 1690 1695

Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp  
1700 1705 1710

Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Ile  
1715 1720 1725

Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Arg Pro Asp  
1730 1735 1740

Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr  
1745 1750 1755

Lys Ile His Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro  
1760 1765 1770

Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu  
1775 1780 1785

Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln  
1790 1795 1800

Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys  
1805 1810 1815

Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly  
1820 1825 1830

Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr  
1835 1840 1845

Thr Ile Gln Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro

1850

1855

1860

Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr

1865

1870

1875

Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro

1880

1885

1890

Ser Thr Val Gln Lys Thr Pro Phe Ile Thr Asn Pro Gly Tyr Asp

1895

1900

1905

Thr Gly Asn Gly Ile Gln Leu Pro Gly Thr Ser Gly Gln Gln Pro

1910

1915

1920

Ser Leu Gly Gln Gln Met Ile Phe Glu Glu His Gly Phe Arg Arg

1925

1930

1935

Thr Thr Pro Pro Thr Thr Ala Thr Pro Val Arg His Arg Pro Arg

1940

1945

1950

Pro Tyr Pro Pro Asn Val Asn Glu Glu Ile Gln Ile Gly His Val

1955

1960

1965

Pro Arg Gly Asp Val Asp His His Leu Tyr Pro His Val Val Gly  
1970 1975 1980

Leu Asn Pro Asn Ala Ser Thr Gly Gln Glu Ala Leu Ser Gln Thr  
1985 1990 1995

Thr Ile Ser Trp Thr Pro Phe Gln Glu Ser Ser Glu Tyr Ile Ile  
2000 2005 2010

Ser Cys His Pro Val Gly Ile Asp Glu Glu Pro Leu Gln Phe Arg  
2015 2020 2025

Val Pro Gly Thr Ser Ala Ser Ala Thr Leu Thr Gly Leu Thr Arg  
2030 2035 2040

Gly Ala Thr Tyr Asn Ile Ile Val Glu Ala Val Lys Asp Gln Gln  
2045 2050 2055

Arg Gln Lys Val Arg Glu Glu Val Val Thr Val Gly Asn Ser Val  
2060 2065 2070

Asp Gln Gly Leu Ser Gln Pro Thr Asp Asp Ser Cys Phe Asp Pro  
2075 2080 2085

Tyr Thr Val Ser His Tyr Ala Ile Gly Glu Glu Trp Glu Arg Leu  
2090 2095 2100

Ser Asp Ser Gly Phe Lys Leu Ser Cys Gln Cys Leu Gly Phe Gly  
2105 2110 2115

Ser Gly His Phe Arg Cys Asp Ser Ser Lys Trp Cys His Asp Asn  
2120 2125 2130

Gly Val Asn Tyr Lys Ile Gly Glu Lys Trp Asp Arg Gln Gly Glu  
2135 2140 2145

Asn Gly Gln Met Met Ser Cys Thr Cys Leu Gly Asn Gly Lys Gly  
2150 2155 2160

Glu Phe Lys Cys Asp Pro His Glu Ala Thr Cys Tyr Asp Asp Gly  
2165 2170 2175



Lys Thr Tyr His Val Gly Glu Gln Trp Gln Lys Glu Tyr Leu Gly  
2180 2185 2190

Ala Ile Cys Ser Cys Thr Cys Phe Gly Gly Gln Arg Gly Trp Arg  
2195 2200 2205

Cys Asp Asn Cys Arg Arg Pro Gly Ala Glu Pro Gly Asn Glu Gly  
2210 2215 2220

Ser Thr Ala His Ser Tyr Asn Gln Tyr Ser Gln Arg Tyr His Gln  
2225 2230 2235

Arg Thr Asn Thr Asn Val Asn Cys Pro Ile Glu Cys Phe Met Pro  
2240 2245 2250

Leu Asp Val Gln Ala Asp Arg Glu Asp Ser Arg Glu  
2255 2260 2265

<210> 12

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<400> 12

AAGCAGCAGG ACUUCUCAA G

21

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 984

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;300&gt;

&lt;308&gt; AF106007

&lt;309&gt; 1999-02-08

&lt;313&gt; (1)..(984)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(984)

&lt;400&gt; 13

atg gag cga agg aac cac act ggg aga gtg agt gaa ttt gtg ttg ctg 48

Met Glu Arg Arg Asn His Thr Gly Arg Val Ser Glu Phe Val Leu Leu

1 5 10 15

ggt ttc cca gct cct gcc cca ctg cgg gca cta cta ttt ttc ctt tct 96

Gly Phe Pro Ala Pro Ala Pro Leu Arg Ala Leu Leu Phe Phe Leu Ser

20 25 30

ctg ttg gcc tac gtg ttg gtg ctg act gaa aac ata ctc atc att aca 144

Leu Leu Ala Tyr Val Leu Val Leu Thr Glu Asn Ile Leu Ile Ile Thr

35

40

45

gca att agg aac cac ccc acc ctc cac aaa ccc atg tat ttt ttc ttg 192

Ala Ile Arg Asn His Pro Thr Leu His Lys Pro Met Tyr Phe Phe Leu

50

55

60

gct aat atg tca ttc ctg gag att tgg tat gtc act gtt acg att cct 240

Ala Asn Met Ser Phe Leu Glu Ile Trp Tyr Val Thr Val Thr Ile Pro

65

70

75

80

aag atg ctt gct ggc ttc att ggt tcc gag gag aat cat gga cag ctg 288

Lys Met Leu Ala Gly Phe Ile Gly Ser Glu Glu Asn His Gly Gln Leu

85

90

95

atc tcc ttt gag gca tgc atg aca cag ctc tac ttt ttc cta ggc ttg 336

Ile Ser Phe Glu Ala Cys Met Thr Gln Leu Tyr Phe Phe Leu Gly Leu

100

105

110

ggt tgc aca gag tgt gtc ctt ctt gct gtc atg gcc tat gac cgc tat 384

Gly Cys Thr Glu Cys Val Leu Leu Ala Val Met Ala Tyr Asp Arg Tyr

115

120

125

gtg gcc atc tgt cac cca ctc cac tat cct gtc att gtc agt agc cgg 432

Val Ala Ile Cys His Pro Leu His Tyr Pro Val Ile Val Ser Ser Arg

130

135

140

cta tgt gtg cag atg gca gct gga tcc tgg gct gga ggt ttt ggt atc 480

Leu Cys Val Gln Met Ala Ala Gly Ser Trp Ala Gly Gly Phe Gly Ile

145	150	155	160	
tcc atg gtt aaa gtt ttc ctc att tct cgc ctg tct tac tgt ggc ccc				528
Ser Met Val Lys Val Phe Leu Ile Ser Arg Leu Ser Tyr Cys Gly Pro				
	165	170	175	
aac acc atc aac cac ttt ttc tgt gat gtt tct cca ttg ctc aac ttg				576
Asn Thr Ile Asn His Phe Phe Cys Asp Val Ser Pro Leu Leu Asn Leu				
	180	185	190	
tca tgc act gac atg tcc aca gca gag ctt aca gac ttt atc ctg gcc				624
Ser Cys Thr Asp Met Ser Thr Ala Glu Leu Thr Asp Phe Ile Leu Ala				
	195	200	205	
att ttt att ctg ctg ggg cca ctc tct gtc act ggg gct tcc tat atg				672
Ile Phe Ile Leu Leu Gly Pro Leu Ser Val Thr Gly Ala Ser Tyr Met				
	210	215	220	
gcc atc aca ggt gca gtg atg cgc atc ccc tca gct gct ggc cgc cat				720
Ala Ile Thr Gly Ala Val Met Arg Ile Pro Ser Ala Ala Gly Arg His				
	225	230	235	240
aag gcc ttt tca acc tgt gcc tcc cac ctc act gtt gtg att atc ttc				768
Lys Ala Phe Ser Thr Cys Ala Ser His Leu Thr Val Val Ile Ile Phe				
	245	250	255	
tat gca gcc agt att ttc atc tat gcc agg cct aag gca ctc tca gct				816
Tyr Ala Ala Ser Ile Phe Ile Tyr Ala Arg Pro Lys Ala Leu Ser Ala				
	260	265	270	

ttt gac acc aac aag ctg gtc tct gta ctc tac gct gtc att gta cca 864  
Phe Asp Thr Asn Lys Leu Val Ser Val Leu Tyr Ala Val Ile Val Pro  
275 280 285

ttg ctc aat ccc atc atc tac tgc ttg cgc aat caa gaa gtc aaa aaa 912  
Leu Leu Asn Pro Ile Ile Tyr Cys Leu Arg Asn Gln Glu Val Lys Lys  
290 295 300

gcc cta cgt cgc act ctg cac ctg gcc caa ggc cag gac gcc aat acc 960  
Ala Leu Arg Arg Thr Leu His Leu Ala Gln Gly Gln Asp Ala Asn Thr  
305 310 315 320

aag aaa tcc agc aga gat ggt tag 984  
Lys Lys Ser Ser Arg Asp Gly  
325

<210> 14

<211> 327

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

Met Glu Arg Arg Asn His Thr Gly Arg Val Ser Glu Phe Val Leu Leu  
1 5 10 15

Gly Phe Pro Ala Pro Ala Pro Leu Arg Ala Leu Leu Phe Phe Leu Ser  
20 25 30

Leu Leu Ala Tyr Val Leu Val Leu Thr Glu Asn Ile Leu Ile Ile Thr  
35 40 45

Ala Ile Arg Asn His Pro Thr Leu His Lys Pro Met Tyr Phe Phe Leu  
50 55 60

Ala Asn Met Ser Phe Leu Glu Ile Trp Tyr Val Thr Val Thr Ile Pro  
65 70 75 80

Lys Met Leu Ala Gly Phe Ile Gly Ser Glu Glu Asn His Gly Gln Leu  
85 90 95

Ile Ser Phe Glu Ala Cys Met Thr Gln Leu Tyr Phe Phe Leu Gly Leu  
100 105 110

Gly Cys Thr Glu Cys Val Leu Leu Ala Val Met Ala Tyr Asp Arg Tyr  
115 120 125

Val Ala Ile Cys His Pro Leu His Tyr Pro Val Ile Val Ser Ser Arg

130

135

140

Leu Cys Val Gln Met Ala Ala Gly Ser Trp Ala Gly Gly Phe Gly Ile

145

150

155

160

Ser Met Val Lys Val Phe Leu Ile Ser Arg Leu Ser Tyr Cys Gly Pro

165

170

175

Asn Thr Ile Asn His Phe Phe Cys Asp Val Ser Pro Leu Leu Asn Leu

180

185

190

Ser Cys Thr Asp Met Ser Thr Ala Glu Leu Thr Asp Phe Ile Leu Ala

195

200

205

Ile Phe Ile Leu Leu Gly Pro Leu Ser Val Thr Gly Ala Ser Tyr Met

210

215

220

Ala Ile Thr Gly Ala Val Met Arg Ile Pro Ser Ala Ala Gly Arg His

225

230

235

240

Lys Ala Phe Ser Thr Cys Ala Ser His Leu Thr Val Val Ile Ile Phe

245

250

255

Tyr Ala Ala Ser Ile Phe Ile Tyr Ala Arg Pro Lys Ala Leu Ser Ala  
260 265 270

Phe Asp Thr Asn Lys Leu Val Ser Val Leu Tyr Ala Val Ile Val Pro  
275 280 285

Leu Leu Asn Pro Ile Ile Tyr Cys Leu Arg Asn Gln Glu Val Lys Lys  
290 295 300

Ala Leu Arg Arg Thr Leu His Leu Ala Gln Gly Gln Asp Ala Asn Thr  
305 310 315 320

Lys Lys Ser Ser Arg Asp Gly  
325

<210> 15

<211> 1325

<212> DNA

<213> Mus musculus

<300>

<308> AF121972



&lt;309&gt; 1999-04-25

&lt;313&gt; (1)..(1325)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (138)..(1112)

&lt;400&gt; 15

aacacactca aatcaaaata atattggatt ggttccatct ggtttcagaa tactcttgtg 60

tttccttgta gaacttaagt ttgacactca taaaaacctt cagacatatt gaaagtaagg 120

gaattgggat taaactc atg tct ctt ttt ccc caa aga aat tta gat gcc 170

Met Ser Leu Phe Pro Gln Arg Asn Leu Asp Ala

1 5 10

atg aac aga tca gca gca cat gta acc gaa ttt gtt ctc ttg gga ttt 218

Met Asn Arg Ser Ala Ala His Val Thr Glu Phe Val Leu Leu Gly Phe

15 20 25

cct ggt tcc tgg aag ata cag att ttc ctc ttc gtg ttg ttt ttg gtg 266

Pro Gly Ser Trp Lys Ile Gln Ile Phe Leu Phe Val Leu Phe Leu Val

30 35 40

ttt tat gtc ttg aca ttg ttg gga aat gga gcc atc atc tgt gca gta 314

Phe Tyr Val Leu Thr Leu Leu Gly Asn Gly Ala Ile Ile Cys Ala Val

45 50 55

aga tgt gac tca cgt cta cat acc ccc atg tac ttc ctc ctg gga aat 362  
Arg Cys Asp Ser Arg Leu His Thr Pro Met Tyr Phe Leu Leu Gly Asn  
60 65 70 75

ttt tcc ttc ctt gaa atc tgg tat gtt tcc tcc act att cct aac ata 410  
Phe Ser Phe Leu Glu Ile Trp Tyr Val Ser Ser Thr Ile Pro Asn Ile  
80 85 90

cta gcc aac att ctg tct aag acc aag gcc atc tca ttt tca ggg tgc 458  
Leu Ala Asn Ile Leu Ser Lys Thr Lys Ala Ile Ser Phe Ser Gly Cys  
95 100 105

ttc ctg cag ttc tat ttc ttc ttt tca ctg ggt aca act gaa tgt ctc 506  
Phe Leu Gln Phe Tyr Phe Phe Phe Ser Leu Gly Thr Thr Glu Cys Leu  
110 115 120

ttc ctg gca gta atg gct tat gat agg tac ctg gcc att tgc cgc cca 554  
Phe Leu Ala Val Met Ala Tyr Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Cys Arg Pro  
125 130 135

tta cat tac cct act atc atg act agg agg ctg tgt tgc att ctg gta 602  
Leu His Tyr Pro Thr Ile Met Thr Arg Arg Leu Cys Cys Ile Leu Val  
140 145 150 155

tcc tca tgc tgg ctc att gga ttt ctt ggg tac cca atc cct atc ttc 650  
Ser Ser Cys Trp Leu Ile Gly Phe Leu Gly Tyr Pro Ile Pro Ile Phe  
160 165 170

tcc att tcc cag ctt ccc ttc tgt ggt tct aat atc att gat cac ttc 698

Ser Ile Ser Gln Leu Pro Phe Cys Gly Ser Asn Ile Ile Asp His Phe

175

180

185

ctc tgt gac atg gac cca ttg atg gct ttg tcc tgt gcc cca gct cct 746

Leu Cys Asp Met Asp Pro Leu Met Ala Leu Ser Cys Ala Pro Ala Pro

190

195

200

att act gaa ttt att ttt tat gcc caa agt tcc ttt gtc ctc ttt ttc 794

Ile Thr Glu Phe Ile Phe Tyr Ala Gln Ser Ser Phe Val Leu Phe Phe

205

210

215

act att gca tac att ctt cgg tcc tat att ttg ttg ctc agg gct gtt 842

Thr Ile Ala Tyr Ile Leu Arg Ser Tyr Ile Leu Leu Leu Arg Ala Val

220

225

230

235

ttt cag gtt cct tct gca gct ggc cga cga aaa gcc ttc tct acc tgt 890

Phe Gln Val Pro Ser Ala Ala Gly Arg Arg Lys Ala Phe Ser Thr Cys

240

245

250

ggc tcc cat tta gtt gtg gtg tca ctc ttc tat ggt aca gta atg gta 938

Gly Ser His Leu Val Val Val Ser Leu Phe Tyr Gly Thr Val Met Val

255

260

265

atg tat gtg agt cct aca tat ggc att cca att ttg atg cag aag atc 986

Met Tyr Val Ser Pro Thr Tyr Gly Ile Pro Ile Leu Met Gln Lys Ile

270

275

280

ctt aca ctt gta tac tct gta atg act cct ctc ttt aat cct ctg att 1034

Leu Thr Leu Val Tyr Ser Val Met Thr Pro Leu Phe Asn Pro Leu Ile

285

290

295

tat agc ctt cgt aac aag gac atg aaa ctt gct ctg aga aat gtt ttg 1082

Tyr Ser Leu Arg Asn Lys Asp Met Lys Leu Ala Leu Arg Asn Val Leu

300

305

310

315

tta gga atg aga att gtc aaa aat atg taa ttcaaagctg ttccatactc 1132

Leu Gly Met Arg Ile Val Lys Asn Met

320

acatgttcta ataaagaaaa aactggagat gaatcaattc attcagttgt ctttaccctt 1192

tgttctatgt ttttgagaca ctgtctcatg tggccctggc tagcctcaaa ctcatctct 1252

agccaaggat gaccttgcaa agatcactta tgtatactct catatcatct gccaatagtg 1312

ataccttgac ctc 1325

<210> 16

<211> 324

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

Met Ser Leu Phe Pro Gln Arg Asn Leu Asp Ala Met Asn Arg Ser Ala

1

5

10

15

Ala His Val Thr Glu Phe Val Leu Leu Gly Phe Pro Gly Ser Trp Lys

20

25

30

Ile Gln Ile Phe Leu Phe Val Leu Phe Leu Val Phe Tyr Val Leu Thr

35

40

45

Leu Leu Gly Asn Gly Ala Ile Ile Cys Ala Val Arg Cys Asp Ser Arg

50

55

60

Leu His Thr Pro Met Tyr Phe Leu Leu Gly Asn Phe Ser Phe Leu Glu

65

70

75

80

Ile Trp Tyr Val Ser Ser Thr Ile Pro Asn Ile Leu Ala Asn Ile Leu

85

90

95

Ser Lys Thr Lys Ala Ile Ser Phe Ser Gly Cys Phe Leu Gln Phe Tyr

100

105

110

Phe Phe Phe Ser Leu Gly Thr Thr Glu Cys Leu Phe Leu Ala Val Met

115

120

125

Ala Tyr Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Cys Arg Pro Leu His Tyr Pro Thr  
130 135 140

Ile Met Thr Arg Arg Leu Cys Cys Ile Leu Val Ser Ser Cys Trp Leu  
145 150 155 160

Ile Gly Phe Leu Gly Tyr Pro Ile Pro Ile Phe Ser Ile Ser Gln Leu  
165 170 175

Pro Phe Cys Gly Ser Asn Ile Ile Asp His Phe Leu Cys Asp Met Asp  
180 185 190

Pro Leu Met Ala Leu Ser Cys Ala Pro Ala Pro Ile Thr Glu Phe Ile  
195 200 205

Phe Tyr Ala Gln Ser Ser Phe Val Leu Phe Phe Thr Ile Ala Tyr Ile  
210 215 220

Leu Arg Ser Tyr Ile Leu Leu Leu Arg Ala Val Phe Gln Val Pro Ser  
225 230 235 240

Ala Ala Gly Arg Arg Lys Ala Phe Ser Thr Cys Gly Ser His Leu Val

245

250

255

Val Val Ser Leu Phe Tyr Gly Thr Val Met Val Met Tyr Val Ser Pro

260

265

270

Thr Tyr Gly Ile Pro Ile Leu Met Gln Lys Ile Leu Thr Leu Val Tyr

275

280

285

Ser Val Met Thr Pro Leu Phe Asn Pro Leu Ile Tyr Ser Leu Arg Asn

290

295

300

Lys Asp Met Lys Leu Ala Leu Arg Asn Val Leu Leu Gly Met Arg Ile

305

310

315

320

Val Lys Asn Met

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 1134

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;300&gt;

<308> AF121980  
<309> 1999-04-25  
<313> (1)..(1134)

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (99)..(99)  
<223> n is a, c, g, or t

<220>  
<221> CDS  
<222> (106)..(1056)

<400> 17  
ccagtccagc ctggtaggct gggcaggtcc tacaggtctt tcagggactg aacccggcat 60  
  
cctgccccctc ccctctccct ggagcctccc tagccctcng gcgtc atg ttg ggt tgg 117  
Met Leu Gly Trp  
1

agc aat ggc acc tac aat gag tcc tac acc agc ttc ctc ctc atg ggc 165  
Ser Asn Gly Thr Tyr Asn Glu Ser Tyr Thr Ser Phe Leu Leu Met Gly  
5 10 15 20

ttc cca ggg atg cag gaa gcc aga gcc ctc ctg gtg ctg ccc ttc ctc 213  
Phe Pro Gly Met Gln Glu Ala Arg Ala Leu Leu Val Leu Pro Phe Leu  
25 30 35



agc ctc tac ctg gtg atc ctc ttc acc aat gcc ctg gtc atc cac acg 261  
Ser Leu Tyr Leu Val Ile Leu Phe Thr Asn Ala Leu Val Ile His Thr  
40 45 50

gtg gca tcc cag cgc agc ctg cac cag ccc atg tac ctg ctc att gcc 309  
Val Ala Ser Gln Arg Ser Leu His Gln Pro Met Tyr Leu Leu Ile Ala  
55 60 65

ctg ctc ctg gct gtc aat atc tgt gct gcc acc acg gtg ctg ccc ccc 357  
Leu Leu Leu Ala Val Asn Ile Cys Ala Ala Thr Thr Val Leu Pro Pro  
70 75 80

atg ctc ttc agc ttc tcc aca cgc ttc aac cgc atc tcc ctc cct cga 405  
Met Leu Phe Ser Phe Ser Thr Arg Phe Asn Arg Ile Ser Leu Pro Arg  
85 90 95 100

tgc ttg gga cag atg ttc tgc atc tac ttt ctg gtt tct atg gac tgc 453  
Cys Leu Gly Gln Met Phe Cys Ile Tyr Phe Leu Val Ser Met Asp Cys  
105 110 115

aac atc ctc ctg gtc atg gct cta gat cgc tat gtg gct atc tgc tac 501  
Asn Ile Leu Leu Val Met Ala Leu Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys Tyr  
120 125 130

cct ctc cgc tac cca gaa ata gtg aca gga cag tta ctg gct ggt ctg 549  
Pro Leu Arg Tyr Pro Glu Ile Val Thr Gly Gln Leu Leu Ala Gly Leu  
135 140 145

gtg gtg ttg gca gtc acc agg agc aca agc att gtt gct cca gtg gtg 597

Val Val Leu Ala Val Thr Arg Ser Thr Ser Ile Val Ala Pro Val Val

150

155

160

gtg ctg gcc tcg cgg gtt cgc ttc tgc cgc tca gat gtg atc cgc cac 645

Val Leu Ala Ser Arg Val Arg Phe Cys Arg Ser Asp Val Ile Arg His

165

170

175

180

ttt gcc tgt gag cac atg gcc ctg atg aag ctc tcc tgt gga gac atc 693

Phe Ala Cys Glu His Met Ala Leu Met Lys Leu Ser Cys Gly Asp Ile

185

190

195

tcg ctg aat aaa acg gcg gga ctc att att cga acc ttt aat aga gtc 741

Ser Leu Asn Lys Thr Ala Gly Leu Ile Ile Arg Thr Phe Asn Arg Val

200

205

210

ctg gat atg ctc ctt cta ggc acc tcc tac tcc cgc atc atc cat gct 789

Leu Asp Met Leu Leu Leu Gly Thr Ser Tyr Ser Arg Ile Ile His Ala

215

220

225

gcc ttc agg atc tca tca ggt gga gca cgg tcc aaa gcc ctg aac acc 837

Ala Phe Arg Ile Ser Ser Gly Gly Ala Arg Ser Lys Ala Leu Asn Thr

230

235

240

tgt ggt tcc cac ctg ctg gtc atc ttc acc gtc tac tcc tcc acc atg 885

Cys Gly Ser His Leu Leu Val Ile Phe Thr Val Tyr Ser Ser Thr Met

245

250

255

260

tcc tca tcc att gtc tac cgt gtg gct cgc act gcc tcc caa gat gtg 933

Ser Ser Ser Ile Val Tyr Arg Val Ala Arg Thr Ala Ser Gln Asp Val

265

270

275

cac aac ctg ctc agt gct ttc tat ctg ttg ctc ccg tgt ctg gtc aac 981

His Asn Leu Leu Ser Ala Phe Tyr Leu Leu Leu Pro Cys Leu Val Asn

280

285

290

ccc atc atc tac ggg gcc aga acc aag gaa atc agg cag cac ctg gta 1029.

Pro Ile Ile Tyr Gly Ala Arg Thr Lys Glu Ile Arg Gln His Leu Val

295

300

305

agg tca ttc ctg agt gca ggc ccc tga ctctcctatg atcagtcctgt 1076

Arg Ser Phe Leu Ser Ala Gly Pro

310

315

gttgcccct cagtattcct ggtgaaactg aggaaggaag aaatggagtc agagggac 1134

<210> 18

<211> 316

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 18

Met Leu Gly Trp Ser Asn Gly Thr Tyr Asn Glu Ser Tyr Thr Ser Phe

1

5

10

15

Leu Leu Met Gly Phe Pro Gly Met Gln Glu Ala Arg Ala Leu Leu Val

20

25

30

Leu Pro Phe Leu Ser Leu Tyr Leu Val Ile Leu Phe Thr Asn Ala Leu

35

40

45

Val Ile His Thr Val Ala Ser Gln Arg Ser Leu His Gln Pro Met Tyr

50

55

60

Leu Leu Ile Ala Leu Leu Leu Ala Val Asn Ile Cys Ala Ala Thr Thr

65

70

75

80

Val Leu Pro Pro Met Leu Phe Ser Phe Ser Thr Arg Phe Asn Arg Ile

85

90

95

Ser Leu Pro Arg Cys Leu Gly Gln Met Phe Cys Ile Tyr Phe Leu Val

100

105

110

Ser Met Asp Cys Asn Ile Leu Leu Val Met Ala Leu Asp Arg Tyr Val

115

120

125

Ala Ile Cys Tyr Pro Leu Arg Tyr Pro Glu Ile Val Thr Gly Gln Leu

130

135

140

Leu Ala Gly Leu Val Val Leu Ala Val Thr Arg Ser Thr Ser Ile Val  
145 150 155 160

Ala Pro Val Val Val Leu Ala Ser Arg Val Arg Phe Cys Arg Ser Asp  
165 170 175

Val Ile Arg His Phe Ala Cys Glu His Met Ala Leu Met Lys Leu Ser  
180 185 190

Cys Gly Asp Ile Ser Leu Asn Lys Thr Ala Gly Leu Ile Ile Arg Thr  
195 200 205

Phe Asn Arg Val Leu Asp Met Leu Leu Leu Gly Thr Ser Tyr Ser Arg  
210 215 220

Ile Ile His Ala Ala Phe Arg Ile Ser Ser Gly Gly Ala Arg Ser Lys  
225 230 235 240

Ala Leu Asn Thr Cys Gly Ser His Leu Leu Val Ile Phe Thr Val Tyr  
245 250 255

Ser Ser Thr Met Ser Ser Ser Ile Val Tyr Arg Val Ala Arg Thr Ala  
260 265 270

Ser Gln Asp Val His Asn Leu Leu Ser Ala Phe Tyr Leu Leu Leu Pro  
275 280 285

Cys Leu Val Asn Pro Ile Ile Tyr Gly Ala Arg Thr Lys Glu Ile Arg  
290 295 300

Gln His Leu Val Arg Ser Phe Leu Ser Ala Gly Pro  
305 310 315

<210> 19

<211> 1421

<212> DNA

<213> Mus musculus

<300>

<308> AF121976

<309> 1999-12-25

<313> (1)..(1421)

<220>

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (291)..(1310)

&lt;400&gt; 19

agaaagattt caggagtcct taaagacggc acagaaaacc ggtacagact gcaccattca 60

gctgaaagcc agacgtaaca gcaccacggg ggtggtgaac acggtgggct cagagaatcc 120

ggataagcct gcttttttat actaagttgg cattataaaa aagcattgct tatcaatttg 180

ttgcaacgaa caggtcacta tcagtcaaaa taaaatcatt atttgatttc aattttgtcc 240

cactccctgc ctctgtcatc acgatactgt gatgccatgg tgtccgactt atg ccc 296

Met Pro

1

gag aag atg ttg agc aaa ctt atc gct tat ctg ctt ctc ata gag tct 344

Glu Lys Met Leu Ser Lys Leu Ile Ala Tyr Leu Leu Leu Ile Glu Ser

5

10

15

tgc aga caa act gcg caa ctc gtg aaa ggt agg cgg atc tgg gtc gac 392

Cys Arg Gln Thr Ala Gln Leu Val Lys Gly Arg Arg Ile Trp Val Asp

20

25

30

tct agg cct cac tgg cct aat acg act cac tat agg gag ctc gag gat 440

Ser Arg Pro His Trp Pro Asn Thr Thr His Tyr Arg Glu Leu Glu Asp

35

40

45

50

cag cat gtt tgg att gct att ccc ttc tgc tcc atg tac atc ctt gct 488

Gln His Val Trp Ile Ala Ile Pro Phe Cys Ser Met Tyr Ile Leu Ala

55

60

65

ctg gtt gga aat ggt acc atc ctc tat atc att ata aca gac agg gct 536

Leu Val Gly Asn Gly Thr Ile Leu Tyr Ile Ile Ile Thr Asp Arg Ala

70

75

80

ctc cat gag cca atg tac ctc ttc ttg tgt ctg ctt tct atc act gat 584

Leu His Glu Pro Met Tyr Leu Phe Leu Cys Leu Leu Ser Ile Thr Asp

85

90

95

ctg gtt ctc tgt tca aca aca ttg cct aaa atg ctg gca ata ttc tgg 632

Leu Val Leu Cys Ser Thr Thr Leu Pro Lys Met Leu Ala Ile Phe Trp

100

105

110

ctc aga tcc cat gtc att tcc tac cat ggc tgc ctc act cag atg ttt 680

Leu Arg Ser His Val Ile Ser Tyr His Gly Cys Leu Thr Gln Met Phe

115

120

125

130

ttt gta cat gca gtc ttt gcc aca gag tca gct gtt ctg ctg gcc atg 728

Phe Val His Ala Val Phe Ala Thr Glu Ser Ala Val Leu Leu Ala Met

135

140

145

gct ttt gat cga tat gtt gct atc tgc aga cca ctc cac tat aca tcc 776

Ala Phe Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys Arg Pro Leu His Tyr Thr Ser

150

155

160

atc ctc aat gct gtt gta att ggg aag att ggc ctg gca tgc gtg act 824

Ile Leu Asn Ala Val Val Ile Gly Lys Ile Gly Leu Ala Cys Val Thr



165	170	175	
cgt ggc ctt ctc ttt gtc ttc ccc ttt gtc att ctc att gaa cgt tta			872
Arg Gly Leu Leu Phe Val Phe Pro Phe Val Ile Leu Ile Glu Arg Leu			
180	185	190	
ccc ttc tgt gga cat cat ata atc cct cac act tac tgt gag cac atg			920
Pro Phe Cys Gly His His Ile Ile Pro His Thr Tyr Cys Glu His Met			
195	200	205	210
ggc ata gcc aag ctc gcc tgt gcc agc atc aag cct aac acc atc tat			968
Gly Ile Ala Lys Leu Ala Cys Ala Ser Ile Lys Pro Asn Thr Ile Tyr			
215	220	225	
ggt ctt act gta gca ctt tca gtc act ggc atg gat gtg gtc ctc att			1016
Gly Leu Thr Val Ala Leu Ser Val Thr Gly Met Asp Val Val Leu Ile			
230	235	240	
gca acc tcc tac atc ctg att ctg cag gcc gtg ctg cga ctg ccc tca			1064
Ala Thr Ser Tyr Ile Leu Ile Leu Gln Ala Val Leu Arg Leu Pro Ser			
245	250	255	
aag gat gcc cag ttc cga gca ttc agc aca tgt gga gcc cac att tgt			1112
Lys Asp Ala Gln Phe Arg Ala Phe Ser Thr Cys Gly Ala His Ile Cys			
260	265	270	
gta att ctt gtc ttc tat atc ccc gca ttc ttt tca ttt ttc act cac			1160
Val Ile Leu Val Phe Tyr Ile Pro Ala Phe Phe Ser Phe Phe Thr His			
275	280	285	290

cgc ttt ggt cac cac gtg cct cct cag gta cac atc ata ctt gca aat 1208  
 Arg Phe Gly His His Val Pro Pro Gln Val His Ile Ile Leu Ala Asn  
 295 300 305

ctt tat ctc ctt gtg cct cct gtt ctc aac ccc cta gtc tat ggc atc 1256  
 Leu Tyr Leu Leu Val Pro Pro Val Leu Asn Pro Leu Val Tyr Gly Ile  
 310 315 320

aat acc aaa caa atc cgc ctg aga ata ctt gac ttt ttt gta aag aga 1304  
 Asn Thr Lys Gln Ile Arg Leu Arg Ile Leu Asp Phe Phe Val Lys Arg  
 325 330 335

agg tga caataatctc cacatataacc aaaggctaag gagttcctgg ctttagtttg 1360  
 Arg

ctgcttctgc tgatctcagt aagtcagtggt atgtacattt aagattttga gatctagagc 1420

a 1421

<210> 20  
 <211> 339  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 20

Met Pro Glu Lys Met Leu Ser Lys Leu Ile Ala Tyr Leu Leu Leu Ile

1                      5                      10                      15

Glu Ser Cys Arg Gln Thr Ala Gln Leu Val Lys Gly Arg Arg Ile Trp

20                      25                      30

Val Asp Ser Arg Pro His Trp Pro Asn Thr Thr His Tyr Arg Glu Leu

35                      40                      45

Glu Asp Gln His Val Trp Ile Ala Ile Pro Phe Cys Ser Met Tyr Ile

50                      55                      60

Leu Ala Leu Val Gly Asn Gly Thr Ile Leu Tyr Ile Ile Ile Thr Asp

65                      70                      75                      80

Arg Ala Leu His Glu Pro Met Tyr Leu Phe Leu Cys Leu Leu Ser Ile

85                      90                      95

Thr Asp Leu Val Leu Cys Ser Thr Thr Leu Pro Lys Met Leu Ala Ile

100                      105                      110

Phe Trp Leu Arg Ser His Val Ile Ser Tyr His Gly Cys Leu Thr Gln

115

120

125

Met Phe Phe Val His Ala Val Phe Ala Thr Glu Ser Ala Val Leu Leu

130

135

140

Ala Met Ala Phe Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys Arg Pro Leu His Tyr

145

150

155

160

Thr Ser Ile Leu Asn Ala Val Val Ile Gly Lys Ile Gly Leu Ala Cys

165

170

175

Val Thr Arg Gly Leu Leu Phe Val Phe Pro Phe Val Ile Leu Ile Glu

180

185

190

Arg Leu Pro Phe Cys Gly His His Ile Ile Pro His Thr Tyr Cys Glu

195

200

205

His Met Gly Ile Ala Lys Leu Ala Cys Ala Ser Ile Lys Pro Asn Thr

210

215

220

Ile Tyr Gly Leu Thr Val Ala Leu Ser Val Thr Gly Met Asp Val Val



<210> 21

<211> 930

<212> DNA

<213> M.musculus

<300>

<308> X92969

<309> 1996-07-01

<313> (1).. (930)

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (930)

<400> 21

atg cag aga aat aac ttc act gaa gtg ata gag ttc gtc ttc ctg gga 48

Met Gln Arg Asn Asn Phe Thr Glu Val Ile Glu Phe Val Phe Leu Gly

1 5 10 15

ttc tcc agc ttt gga aag cat cag ata acc ctc ttt gtg gtt ttc cta 96

Phe Ser Ser Phe Gly Lys His Gln Ile Thr Leu Phe Val Val Phe Leu

20 25 30

acc atc tac att tta act ctg gct ggc aac atc att ata gtg aca atc 144

Thr Ile Tyr Ile Leu Thr Leu Ala Gly Asn Ile Ile Ile Val Thr Ile

35 40 45

aca cac ata gac cac cac ctt cac act ccc atg tac ttc ttt ctg agc 192  
Thr His Ile Asp His His Leu His Thr Pro Met Tyr Phe Phe Leu Ser  
50 55 60

atg ttg gca agc tca gag act gtg tac aca ctg gtc att gtc cca cga 240  
Met Leu Ala Ser Ser Glu Thr Val Tyr Thr Leu Val Ile Val Pro Arg  
65 70 75 80

atg ctt tcc agc ctg att ttt tac aac ctt ccc ata tcc ttg gca ggc 288  
Met Leu Ser Ser Leu Ile Phe Tyr Asn Leu Pro Ile Ser Leu Ala Gly  
85 90 95

tgc gca acc caa atg ttc ttt ttt gtc act ttg gcc acc aac aac tgc 336  
Cys Ala Thr Gln Met Phe Phe Phe Val Thr Leu Ala Thr Asn Asn Cys  
100 105 110

ttt ctg ctc aca gca atg ggt tat gat cgt tat gtg gct att tgt aat 384

Phe Leu Leu Thr Ala Met Gly Tyr Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys Asn

115

120

125

cct ctg aga tat aca atc atc atg agc aag gga atg tgt gcc ttg ttg 432

Pro Leu Arg Tyr Thr Ile Ile Met Ser Lys Gly Met Cys Ala Leu Leu

130

135

140

gtc tgt ggg tct tta ggc act ggc ctg gtt atg gca gtt ctt cat gtg 480

Val Cys Gly Ser Leu Gly Thr Gly Leu Val Met Ala Val Leu His Val

145

150

155

160

cca gcc atg ttc cat ttg ccc ttt tgt ggc acg gtg gtg gag cac ttt 528

Pro Ala Met Phe His Leu Pro Phe Cys Gly Thr Val Val Glu His Phe

165

170

175

ttc tgt gac ata tac cca gta atg aag ctt tct tgt gtt gat acc act 576

Phe Cys Asp Ile Tyr Pro Val Met Lys Leu Ser Cys Val Asp Thr Thr

180

185

190

gtc aat gag ata atc aat tat ggt gta agt tca ttt gta att ctt gtg 624

Val Asn Glu Ile Ile Asn Tyr Gly Val Ser Ser Phe Val Ile Leu Val

195

200

205

ccc ata ggg ctg ata ttt atc tcc tat gtg ctc att gtc tct tcc atc 672

Pro Ile Gly Leu Ile Phe Ile Ser Tyr Val Leu Ile Val Ser Ser Ile

210

215

220

ctt aaa att gtg tcc act gaa ggc cag aag aaa gcc ttt gcc acc tgt 720

Leu Lys Ile Val Ser Thr Glu Gly Gln Lys Lys Ala Phe Ala Thr Cys



225                      230                      235                      240

gcc tct cat ctc act gtg gtc att gtc cac tat ggc tgt gcc tcc att                      768  
Ala Ser His Leu Thr Val Val Ile Val His Tyr Gly Cys Ala Ser Ile

                    245                      250                      255

gcc tac ctc aaa ccc aaa tca gaa agt tca gta gaa aaa gac ctt ctt                      816  
Ala Tyr Leu Lys Pro Lys Ser Glu Ser Ser Val Glu Lys Asp Leu Leu

                    260                      265                      270

ctc tct gtg acc tac act atc atc act ccc ttg ctg aac cct gtt gtc                      864  
Leu Ser Val Thr Tyr Thr Ile Ile Thr Pro Leu Leu Asn Pro Val Val

                    275                      280                      285

tac agc ctc agg aac aaa gaa gtc aaa gat gct cta tgc aga gct gtg                      912  
Tyr Ser Leu Arg Asn Lys Glu Val Lys Asp Ala Leu Cys Arg Ala Val

                    290                      295                      300

ggc aga aac act tct taa                      930  
Gly Arg Asn Thr Ser

305

<210> 22  
<211> 309  
<212> PRT  
<213> M.musculus

<400> 22

Met Gln Arg Asn Asn Phe Thr Glu Val Ile Glu Phe Val Phe Leu Gly

1                      5                      10                      15

Phe Ser Ser Phe Gly Lys His Gln Ile Thr Leu Phe Val Val Phe Leu

20                      25                      30

Thr Ile Tyr Ile Leu Thr Leu Ala Gly Asn Ile Ile Ile Val Thr Ile

35                      40                      45

Thr His Ile Asp His His Leu His Thr Pro Met Tyr Phe Phe Leu Ser

50                      55                      60

Met Leu Ala Ser Ser Glu Thr Val Tyr Thr Leu Val Ile Val Pro Arg

65                      70                      75                      80

Met Leu Ser Ser Leu Ile Phe Tyr Asn Leu Pro Ile Ser Leu Ala Gly

85                      90                      95

Cys Ala Thr Gln Met Phe Phe Phe Val Thr Leu Ala Thr Asn Asn Cys

100                      105                      110

Phe Leu Leu Thr Ala Met Gly Tyr Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys Asn  
115 120 125

Pro Leu Arg Tyr Thr Ile Ile Met Ser Lys Gly Met Cys Ala Leu Leu  
130 135 140

Val Cys Gly Ser Leu Gly Thr Gly Leu Val Met Ala Val Leu His Val  
145 150 155 160

Pro Ala Met Phe His Leu Pro Phe Cys Gly Thr Val Val Glu His Phe  
165 170 175

Phe Cys Asp Ile Tyr Pro Val Met Lys Leu Ser Cys Val Asp Thr Thr  
180 185 190

Val Asn Glu Ile Ile Asn Tyr Gly Val Ser Ser Phe Val Ile Leu Val  
195 200 205

Pro Ile Gly Leu Ile Phe Ile Ser Tyr Val Leu Ile Val Ser Ser Ile  
210 215 220

Leu Lys Ile Val Ser Thr Glu Gly Gln Lys Lys Ala Phe Ala Thr Cys

225                      230                      235                      240

Ala Ser His Leu Thr Val Val Ile Val His Tyr Gly Cys Ala Ser Ile  
                            245                      250                      255

Ala Tyr Leu Lys Pro Lys Ser Glu Ser Ser Val Glu Lys Asp Leu Leu  
                            260                      265                      270

Leu Ser Val Thr Tyr Thr Ile Ile Thr Pro Leu Leu Asn Pro Val Val  
                            275                      280                      285

Tyr Ser Leu Arg Asn Lys Glu Val Lys Asp Ala Leu Cys Arg Ala Val  
                            290                      295                      300

Gly Arg Asn Thr Ser  
305

<210> 23  
<211> 957  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<300>

<308> AB061229

<309> 2001-09-07

<313> (1)..(957)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(957)

<400> 23

atg ata ctg tct gaa aaa aac aat agt ggg att att ttc acc ctc ttg	48
Met Ile Leu Ser Glu Lys Asn Asn Ser Gly Ile Ile Phe Thr Leu Leu	
1                      5                      10                      15	

ggc ttc tca gat tat cct gac ctt aaa gtc cct ctc ttc ttg gtg ttt	96
Gly Phe Ser Asp Tyr Pro Asp Leu Lys Val Pro Leu Phe Leu Val Phe	
20                      25                      30	

ctc gtc att tac agc atc act gtg gta gga aat att ggt atg atc ctc	144
Leu Val Ile Tyr Ser Ile Thr Val Val Gly Asn Ile Gly Met Ile Leu	
35                      40                      45	

gtg atc aga att aat ccc caa ctg cac tcc cct atg tac ttc ttc ctc	192
Val Ile Arg Ile Asn Pro Gln Leu His Ser Pro Met Tyr Phe Phe Leu	
50                      55                      60	

agc cac ctc tcc ttt gtg gat ttc tgc tat tct tcg atc att gct ccc	240
Ser His Leu Ser Phe Val Asp Phe Cys Tyr Ser Ser Ile Ile Ala Pro	
65                      70                      75                      80	

aag atg ctg gtg aac ctt gtt gca aaa gac ata acc att tca ttt gta 288  
Lys Met Leu Val Asn Leu Val Ala Lys Asp Ile Thr Ile Ser Phe Val  
85 90 95

gaa tgc ata gta caa tat ttt tta ttt tgt gtc ttt gta gta act gaa 336  
Glu Cys Ile Val Gln Tyr Phe Leu Phe Cys Val Phe Val Val Thr Glu  
100 105 110

gcc ttt tta tta gtg gtt atg gca tat gac cga ttt gtg gct atc tgt 384  
Ala Phe Leu Leu Val Val Met Ala Tyr Asp Arg Phe Val Ala Ile Cys  
115 120 125

aac cct ctg ctc tac aca gta gcc atg tcc cag aaa ctc tgt atc aca 432  
Asn Pro Leu Leu Tyr Thr Val Ala Met Ser Gln Lys Leu Cys Ile Thr  
130 135 140

ctg gtg gtg gga tcc tac gca tgg ggg ttc aca tgt tcc ttg aca ctg 480  
Leu Val Val Gly Ser Tyr Ala Trp Gly Phe Thr Cys Ser Leu Thr Leu  
145 150 155 160

acg tgt tct act gtg caa tta tct ttt cat ggt gtc aat agg atc gat 528  
Thr Cys Ser Thr Val Gln Leu Ser Phe His Gly Val Asn Arg Ile Asp  
165 170 175

cac ttc ttc tgt gaa ctc tct tca ctg cta gcc ctt tct tcc tct gat 576  
His Phe Phe Cys Glu Leu Ser Ser Leu Leu Ala Leu Ser Ser Ser Asp  
180 185 190

act ctc atc agt caa tta ctg ctg ttt gtc ttt gcc aca ttt aat gct 624  
Thr Leu Ile Ser Gln Leu Leu Leu Phe Val Phe Ala Thr Phe Asn Ala  
195 200 205

gtc agc aca tta ctc ctt att ctg ttg tct tac ctg ttc att gtt gtc 672  
Val Ser Thr Leu Leu Leu Ile Leu Leu Ser Tyr Leu Phe Ile Val Val  
210 215 220

act gtt ctt aag atg cgt tca gcc agt ggg cgt cgt aag gct ttc tcc 720  
Thr Val Leu Lys Met Arg Ser Ala Ser Gly Arg Arg Lys Ala Phe Ser  
225 230 235 240

acc tgt gca tcc cat ctg gca gcc atc act atc ttc cat ggt acc att 768  
Thr Cys Ala Ser His Leu Ala Ala Ile Thr Ile Phe His Gly Thr Ile  
245 250 255

tta ttc ctt ttt tgt gtt ccc aac tct aag aat tcc agg ctc aca gtc 816  
Leu Phe Leu Phe Cys Val Pro Asn Ser Lys Asn Ser Arg Leu Thr Val  
260 265 270

aaa gtg ggc tct gtg ttt tac aca gtg gtg atc ccc atg ctt aac ccc 864  
Lys Val Gly Ser Val Phe Tyr Thr Val Val Ile Pro Met Leu Asn Pro  
275 280 285

ata atc tat agt ctg aga aat aag gat gtc caa gat act att aga aaa 912  
Ile Ile Tyr Ser Leu Arg Asn Lys Asp Val Gln Asp Thr Ile Arg Lys  
290 295 300

ata atg acc ctt atc tca tgt gtt aag aat gat aga cac aat taa 957

Ile Met Thr Leu Ile Ser Cys Val Lys Asn Asp Arg His Asn

305

310

315

<210> 24

<211> 318

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 24

Met Ile Leu Ser Glu Lys Asn Asn Ser Gly Ile Ile Phe Thr Leu Leu

1

5

10

15

Gly Phe Ser Asp Tyr Pro Asp Leu Lys Val Pro Leu Phe Leu Val Phe

20

25

30

Leu Val Ile Tyr Ser Ile Thr Val Val Gly Asn Ile Gly Met Ile Leu

35

40

45

Val Ile Arg Ile Asn Pro Gln Leu His Ser Pro Met Tyr Phe Phe Leu

50

55

60

Ser His Leu Ser Phe Val Asp Phe Cys Tyr Ser Ser Ile Ile Ala Pro

65

70

75

80



Lys Met Leu Val Asn Leu Val Ala Lys Asp Ile Thr Ile Ser Phe Val  
85 90 95

Glu Cys Ile Val Gln Tyr Phe Leu Phe Cys Val Phe Val Val Thr Glu  
100 105 110

Ala Phe Leu Leu Val Val Met Ala Tyr Asp Arg Phe Val Ala Ile Cys  
115 120 125

Asn Pro Leu Leu Tyr Thr Val Ala Met Ser Gln Lys Leu Cys Ile Thr  
130 135 140

Leu Val Val Gly Ser Tyr Ala Trp Gly Phe Thr Cys Ser Leu Thr Leu  
145 150 155 160

Thr Cys Ser Thr Val Gln Leu Ser Phe His Gly Val Asn Arg Ile Asp  
165 170 175

His Phe Phe Cys Glu Leu Ser Ser Leu Leu Ala Leu Ser Ser Ser Asp  
180 185 190

Thr Leu Ile Ser Gln Leu Leu Leu Phe Val Phe Ala Thr Phe Asn Ala  
195 200 205

Val Ser Thr Leu Leu Leu Ile Leu Leu Ser Tyr Leu Phe Ile Val Val  
210 215 220

Thr Val Leu Lys Met Arg Ser Ala Ser Gly Arg Arg Lys Ala Phe Ser  
225 230 235 240

Thr Cys Ala Ser His Leu Ala Ala Ile Thr Ile Phe His Gly Thr Ile  
245 250 255

Leu Phe Leu Phe Cys Val Pro Asn Ser Lys Asn Ser Arg Leu Thr Val  
260 265 270

Lys Val Gly Ser Val Phe Tyr Thr Val Val Ile Pro Met Leu Asn Pro  
275 280 285

Ile Ile Tyr Ser Leu Arg Asn Lys Asp Val Gln Asp Thr Ile Arg Lys  
290 295 300

Ile Met Thr Leu Ile Ser Cys Val Lys Asn Asp Arg His Asn

305

310

315

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; . 1344

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;300&gt;

&lt;308&gt; AJ133424

&lt;309&gt; 2003-02-01

&lt;313&gt; (1)..(1344)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (61)..(1020)

&lt;400&gt; 25

ggaggaagac aatgttgatg ctgattgctg agttcctgca ggtttcaaac cgaatgtacc 60

atg gac aga tcc aat gag acc gcc ccc ctg tcc ggc ttc att ctc ctg 108

Met Asp Arg Ser Asn Glu Thr Ala Pro Leu Ser Gly Phe Ile Leu Leu

1

5

10

15

ggc ctc tct gcc cac cca aag ctg gag aaa acc ttc ttc gtg ctc atc 156

Gly Leu Ser Ala His Pro Lys Leu Glu Lys Thr Phe Phe Val Leu Ile

20	25	30	
ctg atg atg tac ctg gtg atc ctg ctg ggc aac ggc gtc ctc atc ctg			204
Leu Met Met Tyr Leu Val Ile Leu Leu Gly Asn Gly Val Leu Ile Leu			
35	40	45	
gtg agc atc ctc gac tcc cac ctg cac acg ccc atg tac ttc ttc ctg			252
Val Ser Ile Leu Asp Ser His Leu His Thr Pro Met Tyr Phe Phe Leu			
50	55	60	
ggg aac ctc tcc ttc ctg gac atc tgc tac act acc tcc tct gtc ccc			300
Gly Asn Leu Ser Phe Leu Asp Ile Cys Tyr Thr Thr Ser Ser Val Pro			
65	70	75	80
ctc att ctg gac agc ttt ctg act ccc agg aag acc atc tcc ttc tcg			348
Leu Ile Leu Asp Ser Phe Leu Thr Pro Arg Lys Thr Ile Ser Phe Ser			
85	90	95	
ggc tgt gcc gtg cag atg ttt ctc tcc ttc gcc atg gga gcc acg gag			396
Gly Cys Ala Val Gln Met Phe Leu Ser Phe Ala Met Gly Ala Thr Glu			
100	105	110	
tgt gtg ctc ctg agt atg atg gcg ttt gat cgt tat gtg gcc atc tgc			444
Cys Val Leu Leu Ser Met Met Ala Phe Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys			
115	120	125	
aac ccc ctt aga tat cct gtg gtc atg aac aag gct gcc tat gtg ccc			492
Asn Pro Leu Arg Tyr Pro Val Val Met Asn Lys Ala Ala Tyr Val Pro			
130	135	140	

atg gct gcc agt tcc tgg gca ggt ggt atc act aat tct gta gtg cag	540
Met Ala Ala Ser Ser Trp Ala Gly Gly Ile Thr Asn Ser Val Val Gln	
145                      150                      155                      160	
aca tct ttg gca atg cgg ctg ccc ttc tgt ggg gac aat gtc atc aat	588
Thr Ser Leu Ala Met Arg Leu Pro Phe Cys Gly Asp Asn Val Ile Asn	
165                      170                      175	
cac ttc acc tgt gag atc ctg gca gtc ctg aaa ctg gcc tgt gct gac	636
His Phe Thr Cys Glu Ile Leu Ala Val Leu Lys Leu Ala Cys Ala Asp	
180                      185                      190	
atc tcc atc aat gtc atc agc atg gtt gtg gcc aac atg atc ttc ttg	684
Ile Ser Ile Asn Val Ile Ser Met Val Val Ala Asn Met Ile Phe Leu	
195                      200                      205	
gca gtc cca gtc ctc ttc atc ttt gtc tcc tat gtc ttc atc ctt gtg	732
Ala Val Pro Val Leu Phe Ile Phe Val Ser Tyr Val Phe Ile Leu Val	
210                      215                      220	
aca atc ctg agg atc ccc tct gct gag ggg agg aag aag gcc ttc tcc	780
Thr Ile Leu Arg Ile Pro Ser Ala Glu Gly Arg Lys Lys Ala Phe Ser	
225                      230                      235                      240	
acc tgc tct gcc cac ctc acc gtg gta ctt gtc ttc tat gga acc atc	828
Thr Cys Ser Ala His Leu Thr Val Val Leu Val Phe Tyr Gly Thr Ile	
245                      250                      255	

ctc ttc atg tac ggg aag ccc aag tcc aag gac cca ctg ggg gca gac 876  
 Leu Phe Met Tyr Gly Lys Pro Lys Ser Lys Asp Pro Leu Gly Ala Asp  
 260 265 270

aag cag gac ctt gca gac aag ctc atc tcc ctc ttc tat gga gtg gtg 924  
 Lys Gln Asp Leu Ala Asp Lys Leu Ile Ser Leu Phe Tyr Gly Val Val  
 275 280 285

acc ccc atg cta aac ccc atc atc tac agc ttg aga aac aag gac gtg 972  
 Thr Pro Met Leu Asn Pro Ile Ile Tyr Ser Leu Arg Asn Lys Asp Val  
 290 295 300

agg gct gct gtg agg aac ctg gtg ggc cag aaa cac cta act gag tga 1020  
 Arg Ala Ala Val Arg Asn Leu Val Gly Gln Lys His Leu Thr Glu  
 305 310 315

ctgtcacagt gcagaacttc caacctcttc attgtgtttg tgagggaaga gtggtgcaat 1080

gaagaggagc cacttcccca aggtccaagt aatgaactca gaactaagac tataaacaaa 1140

ctatcaacgt tccttaagca ccaatgcttc tagttaacag gctggaagga caagccttta 1200

caccttttga gagaatggct ggttgtcagc tttgtgttca accttagtgg cgtcgtagaa 1260

ctactctttc atgaccagag gctggcacag atctctggaa agatgctgac atgcataact 1320

aggagacaga tgcaaagcct gggt 1344

<210> 26

<211> 319

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 26

Met Asp Arg Ser Asn Glu Thr Ala Pro Leu Ser Gly Phe Ile Leu Leu  
1 5 10 15

Gly Leu Ser Ala His Pro Lys Leu Glu Lys Thr Phe Phe Val Leu Ile  
20 25 30

Leu Met Met Tyr Leu Val Ile Leu Leu Gly Asn Gly Val Leu Ile Leu  
35 40 45

Val Ser Ile Leu Asp Ser His Leu His Thr Pro Met Tyr Phe Phe Leu  
50 55 60

Gly Asn Leu Ser Phe Leu Asp Ile Cys Tyr Thr Thr Ser Ser Val Pro  
65 70 75 80

Leu Ile Leu Asp Ser Phe Leu Thr Pro Arg Lys Thr Ile Ser Phe Ser  
85 90 95

Gly Cys Ala Val Gln Met Phe Leu Ser Phe Ala Met Gly Ala Thr Glu

100

105

110

Cys Val Leu Leu Ser Met Met Ala Phe Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys

115

120

125

Asn Pro Leu Arg Tyr Pro Val Val Met Asn Lys Ala Ala Tyr Val Pro

130

135

140

Met Ala Ala Ser Ser Trp Ala Gly Gly Ile Thr Asn Ser Val Val Gln

145

150

155

160

Thr Ser Leu Ala Met Arg Leu Pro Phe Cys Gly Asp Asn Val Ile Asn

165

170

175

His Phe Thr Cys Glu Ile Leu Ala Val Leu Lys Leu Ala Cys Ala Asp

180

185

190

Ile Ser Ile Asn Val Ile Ser Met Val Val Ala Asn Met Ile Phe Leu

195

200

205



Ala Val Pro Val Leu Phe Ile Phe Val Ser Tyr Val Phe Ile Leu Val  
210 215 220

Thr Ile Leu Arg Ile Pro Ser Ala Glu Gly Arg Lys Lys Ala Phe Ser  
225 230 235 240

Thr Cys Ser Ala His Leu Thr Val Val Leu Val Phe Tyr Gly Thr Ile  
245 250 255

Leu Phe Met Tyr Gly Lys Pro Lys Ser Lys Asp Pro Leu Gly Ala Asp  
260 265 270

Lys Gln Asp Leu Ala Asp Lys Leu Ile Ser Leu Phe Tyr Gly Val Val  
275 280 285

Thr Pro Met Leu Asn Pro Ile Ile Tyr Ser Leu Arg Asn Lys Asp Val  
290 295 300

Arg Ala Ala Val Arg Asn Leu Val Gly Gln Lys His Leu Thr Glu  
305 310 315

<210> 27  
<211> 942  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<300>  
<308> AF102523  
<309> 1999-02-08  
<313> (1)..(942)

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(942)

<400> 27  
atg gcg aac agc act act gtt act gag ttt att ttg ctg ggg ctg tca 48  
Met Ala Asn Ser Thr Thr Val Thr Glu Phe Ile Leu Leu Gly Leu Ser  
1 5 10 15

gat gcc tgt gag ctg cag gtg ctc ata ttc ctg ggc ttt ctc ctg acc 96  
Asp Ala Cys Glu Leu Gln Val Leu Ile Phe Leu Gly Phe Leu Leu Thr  
20 25 30

tac ttc ctc att ctg ctg gga aac ttc ctc atc atc ttc atc acc ctt 144  
Tyr Phe Leu Ile Leu Leu Gly Asn Phe Leu Ile Ile Phe Ile Thr Leu  
35 40 45

gtg gac agg cgc ctt tac acc ccc atg tat tac ttc ctc cgc aac ttt 192

Val Asp Arg Arg Leu Tyr Thr Pro Met Tyr Tyr Phe Leu Arg Asn Phe  
 50 55 60

gcc atg ctg gag atc tgg ttc acc tct gtc atc ttc ccc aag atg cta 240  
 Ala Met Leu Glu Ile Trp Phe Thr Ser Val Ile Phe Pro Lys Met Leu  
 65 70 75 80

acc aac atc atc aca gga cat aag acc atc tcc cta cta ggt tgt ttc 288  
 Thr Asn Ile Ile Thr Gly His Lys Thr Ile Ser Leu Leu Gly Cys Phe  
 85 90 95

ctc caa gca ttc ctc tat ttc ttc ctt ggc acc act gag ttc ttt cta 336  
 Leu Gln Ala Phe Leu Tyr Phe Phe Leu Gly Thr Thr Glu Phe Phe Leu  
 100 105 110

ctg gca gtg atg tcc ttt gac agg tat gtg gcc att tgt aac cct ttg 384  
 Leu Ala Val Met Ser Phe Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys Asn Pro Leu  
 115 120 125

cgt tat gcc acc att atg agc aaa aga gtc tgt gtc cag ctt gtg ttt 432  
 Arg Tyr Ala Thr Ile Met Ser Lys Arg Val Cys Val Gln Leu Val Phe  
 130 135 140

tgc tca tgg atg tct gga ttg ctt ctc atc ata gtt cct agt tca att 480  
 Cys Ser Trp Met Ser Gly Leu Leu Leu Ile Ile Val Pro Ser Ser Ile  
 145 150 155 160

gta ttt cag cag cca ttc tgt ggc cca aac atc att aat cat ttc ttc 528  
 Val Phe Gln Gln Pro Phe Cys Gly Pro Asn Ile Ile Asn His Phe Phe

165	170	175	
tgt gac aac ttt cca ctt atg gaa ctc ata tgt gca gat act agc ctg			576
Cys Asp Asn Phe Pro Leu Met Glu Leu Ile Cys Ala Asp Thr Ser Leu			
180	185	190	
gta gag ttc ctg ggt ttt gtt att gcc aat ttc agc ctc ctg ggc act			624
Val Glu Phe Leu Gly Phe Val Ile Ala Asn Phe Ser Leu Leu Gly Thr			
195	200	205	
ctg gct gtg act gcc acc tgc tat ggc cac att ctc tat acc att cta			672
Leu Ala Val Thr Ala Thr Cys Tyr Gly His Ile Leu Tyr Thr Ile Leu			
210	215	220	
cac att cct tca gcc aag gag agg aag aaa gcc ttc tca act tgc tcc			720
His Ile Pro Ser Ala Lys Glu Arg Lys Lys Ala Phe Ser Thr Cys Ser			
225	230	235	240
tct cat att att gtg gtg tct ctc ttc tac ggc agc tgt atc ttc atg			768
Ser His Ile Ile Val Val Ser Leu Phe Tyr Gly Ser Cys Ile Phe Met			
245	250	255	
tat gtc cgg tct ggc aag aat gga cag ggg gag gat cat aac aag gtg			816
Tyr Val Arg Ser Gly Lys Asn Gly Gln Gly Glu Asp His Asn Lys Val			
260	265	270	
gtg gca ttg ctc aac act gta gtg aca ccc aca ctc aac ccc ttc atc			864
Val Ala Leu Leu Asn Thr Val Val Thr Pro Thr Leu Asn Pro Phe Ile			
275	280	285	

tac act ctg agg aac aag cag gtg aag cag gta ttt agg gaa cac gta 912  
Tyr Thr Leu Arg Asn Lys Gln Val Lys Gln Val Phe Arg Glu His Val  
290 295 300

agc aag ttc caa aag ttc agc cag acg tga 942  
Ser Lys Phe Gln Lys Phe Ser Gln Thr  
305 310

<210> 28  
<211> 313  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 28

Met Ala Asn Ser Thr Thr Val Thr Glu Phe Ile Leu Leu Gly Leu Ser  
1 5 10 15

Asp Ala Cys Glu Leu Gln Val Leu Ile Phe Leu Gly Phe Leu Leu Thr  
20 25 30

Tyr Phe Leu Ile Leu Leu Gly Asn Phe Leu Ile Ile Phe Ile Thr Leu  
35 40 45

Val Asp Arg Arg Leu Tyr Thr Pro Met Tyr Tyr Phe Leu Arg Asn Phe  
50 55 60

Ala Met Leu Glu Ile Trp Phe Thr Ser Val Ile Phe Pro Lys Met Leu  
65 70 75 80

Thr Asn Ile Ile Thr Gly His Lys Thr Ile Ser Leu Leu Gly Cys Phe  
85 90 95

Leu Gln Ala Phe Leu Tyr Phe Phe Leu Gly Thr Thr Glu Phe Phe Leu  
100 105 110

Leu Ala Val Met Ser Phe Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys Asn Pro Leu  
115 120 125

Arg Tyr Ala Thr Ile Met Ser Lys Arg Val Cys Val Gln Leu Val Phe  
130 135 140

Cys Ser Trp Met Ser Gly Leu Leu Leu Ile Ile Val Pro Ser Ser Ile  
145 150 155 160

Val Phe Gln Gln Pro Phe Cys Gly Pro Asn Ile Ile Asn His Phe Phe

165

170

175

Cys Asp Asn Phe Pro Leu Met Glu Leu Ile Cys Ala Asp Thr Ser Leu

180

185

190

Val Glu Phe Leu Gly Phe Val Ile Ala Asn Phe Ser Leu Leu Gly Thr

195

200

205

Leu Ala Val Thr Ala Thr Cys Tyr Gly His Ile Leu Tyr Thr Ile Leu

210

215

220

His Ile Pro Ser Ala Lys Glu Arg Lys Lys Ala Phe Ser Thr Cys Ser

225

230

235

240

Ser His Ile Ile Val Val Ser Leu Phe Tyr Gly Ser Cys Ile Phe Met

245

250

255

Tyr Val Arg Ser Gly Lys Asn Gly Gln Gly Glu Asp His Asn Lys Val

260

265

270

Val Ala Leu Leu Asn Thr Val Val Thr Pro Thr Leu Asn Pro Phe Ile

275

280

285

Tyr Thr Leu Arg Asn Lys Gln Val Lys Gln Val Phe Arg Glu His Val

290

295

300

Ser Lys Phe Gln Lys Phe Ser Gln Thr

305

310

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 669

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;300&gt;

&lt;308&gt; AF102531

&lt;309&gt; 1999-02-08

&lt;313&gt; (1)..(669)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(669)

&lt;400&gt; 29

tgc aac tta gcg acc atg gat att atc tgc acc tcc tct gta ctg ccc 48

Cys Asn Leu Ala Thr Met Asp Ile Ile Cys Thr Ser Ser Val Leu Pro



1	5	10	15	
aag gcg ctg gtt ggt cta ctg tct gag gaa aac acc acc tcc ttc aaa				96
Lys Ala Leu Val Gly Leu Leu Ser Glu Glu Asn Thr Thr Ser Phe Lys				
	20	25	30	
ggg tgc atg act cag ctc ttc ttt ctt gtg tgg tct gga tcc tct gag				144
Gly Cys Met Thr Gln Leu Phe Phe Leu Val Trp Ser Gly Ser Ser Glu				
	35	40	45	
ctg ctg ctg ctc aca gtc atg gcc tat gac cgc tat gtg gcc atc tgt				192
Leu Leu Leu Leu Thr Val Met Ala Tyr Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys				
	50	55	60	
ttg ccc ctg cat tac agc tct agg atg agt cca cag ctc tgt ggg acc				240
Leu Pro Leu His Tyr Ser Ser Arg Met Ser Pro Gln Leu Cys Gly Thr				
65	70	75	80	
ttt gcc gtg ggt gta tgg tcc atc tgc gca cta aat gca tct atc aac				288
Phe Ala Val Gly Val Trp Ser Ile Cys Ala Leu Asn Ala Ser Ile Asn				
	85	90	95	
act ggt ctg atg aca cgg ctg tca ttc tgt ggc ccc aag gtc atc acc				336
Thr Gly Leu Met Thr Arg Leu Ser Phe Cys Gly Pro Lys Val Ile Thr				
	100	105	110	
cac ttc ttc tgt gag att ccc cca ctc ctc ctg ctc tcc tgt agt cct				384
His Phe Phe Cys Glu Ile Pro Pro Leu Leu Leu Leu Ser Cys Ser Pro				
	115	120	125	

aca tat ata aat agc gtt atg act ctt gtg gca gat gcc ttt tat gga 432  
Thr Tyr Ile Asn Ser Val Met Thr Leu Val Ala Asp Ala Phe Tyr Gly  
130 135 140

ggc atc aat ttt tta ctt acc ttg cta tcc tat ggc tgc atc att gcc 480  
Gly Ile Asn Phe Leu Leu Thr Leu Leu Ser Tyr Gly Cys Ile Ile Ala  
145 150 155 160

agc atc ctg cgc atg cgt tct gct gag ggc aag agg aag gcc ttt tct 528  
Ser Ile Leu Arg Met Arg Ser Ala Glu Gly Lys Arg Lys Ala Phe Ser  
165 170 175

acc tgc tca tcc cac ctc att gtg gtc tct gtg tac tac tca tct gtg 576  
Thr Cys Ser Ser His Leu Ile Val Val Ser Val Tyr Tyr Ser Ser Val  
180 185 190

ttc tgt gcc tat gtc agc cct gct tct agc tac agc cca gaa aga agc 624  
Phe Cys Ala Tyr Val Ser Pro Ala Ser Ser Tyr Ser Pro Glu Arg Ser  
195 200 205

aaa gtt tcc tca gtg ctg tac tca gtc ctc agc cca acc ctc aac 669  
Lys Val Ser Ser Val Leu Tyr Ser Val Leu Ser Pro Thr Leu Asn  
210 215 220

<210> 30  
<211> 223  
<212> PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 30

Cys Asn Leu Ala Thr Met Asp Ile Ile Cys Thr Ser Ser Val Leu Pro  
1 5 10 15

Lys Ala Leu Val Gly Leu Leu Ser Glu Glu Asn Thr Thr Ser Phe Lys  
20 25 30

Gly Cys Met Thr Gln Leu Phe Phe Leu Val Trp Ser Gly Ser Ser Glu  
35 40 45

Leu Leu Leu Leu Thr Val Met Ala Tyr Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys  
50 55 60

Leu Pro Leu His Tyr Ser Ser Arg Met Ser Pro Gln Leu Cys Gly Thr  
65 70 75 80

Phe Ala Val Gly Val Trp Ser Ile Cys Ala Leu Asn Ala Ser Ile Asn  
85 90 95

Thr Gly Leu Met Thr Arg Leu Ser Phe Cys Gly Pro Lys Val Ile Thr

100

105

110

His Phe Phe Cys Glu Ile Pro Pro Leu Leu Leu Leu Ser Cys Ser Pro

115

120

125

Thr Tyr Ile Asn Ser Val Met Thr Leu Val Ala Asp Ala Phe Tyr Gly

130

135

140

Gly Ile Asn Phe Leu Leu Thr Leu Leu Ser Tyr Gly Cys Ile Ile Ala

145

150

155

160

Ser Ile Leu Arg Met Arg Ser Ala Glu Gly Lys Arg Lys Ala Phe Ser

165

170

175

Thr Cys Ser Ser His Leu Ile Val Val Ser Val Tyr Tyr Ser Ser Val

180

185

190

Phe Cys Ala Tyr Val Ser Pro Ala Ser Ser Tyr Ser Pro Glu Arg Ser

195

200

205

Lys Val Ser Ser Val Leu Tyr Ser Val Leu Ser Pro Thr Leu Asn

210

215

220

<210> 31

<211> 1661

<212> DNA

<213> Mus musculus

<300>

<308> AF121974

<309> 1999-04-25

<313> (1)..(1661)

<220>

<221> misc\_feature

<222> (3)..(3)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> CDS

<222> (303)..(1307)

<400> 31

gtntacatag tgagttcgag gccagccagg gctacacaga caaacctgt ctcgaaaaac 60

caaaaaaaaa aaaaaaaaaa agaattcatt aatgaaaaag aagggggaaa atggagggcc 120

atggaaagta gctacttcta acatacaact cttcatttcc tccatagaaa tgctgtagtt 180

aatgtctaca cccagtccag cctggtgagg ctggggcagg tcctagcagg gcctttcagg 240  
  
gactgaaccc cggcatcctg cccctcccct ctccctggag cctccccaag ccctcaggcg 300  
  
tc atg tca ggg tgg agc aat ggc acc tac aat gag tcc tac acc agc 347  
Met Ser Gly Trp Ser Asn Gly Thr Tyr Asn Glu Ser Tyr Thr Ser  
1 5 10 15  
  
ttc ctc ctc atg ggc ttc cca ggg atg cag gaa gcc aga gcc ctc ctg 395  
Phe Leu Leu Met Gly Phe Pro Gly Met Gln Glu Ala Arg Ala Leu Leu  
20 25 30  
  
gtg ctg ccc ttc ctc agc ctc tac ctg gtg atc ctc ttc acc aat gcc 443  
Val Leu Pro Phe Leu Ser Leu Tyr Leu Val Ile Leu Phe Thr Asn Ala  
35 40 45  
  
ctg gtc atc cac acg gtg gca tcc cag cgc agc ctg cac cag ccc atg 491  
Leu Val Ile His Thr Val Ala Ser Gln Arg Ser Leu His Gln Pro Met  
50 55 60  
  
tac ctg ctc att gcc ctg ctc ctg gct gtc aat atc tgc gct gcc acc 539  
Tyr Leu Leu Ile Ala Leu Leu Leu Ala Val Asn Ile Cys Ala Ala Thr  
65 70 75  
  
acc gtg gtg ccc ccc atg ctc ttc agc ttc tcc aca cgc ttc aac cgc 587  
Thr Val Val Pro Pro Met Leu Phe Ser Phe Ser Thr Arg Phe Asn Arg  
80 85 90 95  
  
atc tcc ctc cct cga tgc ttg gga caa atg ttc tgc atc tac ttc ctt 635

Ile Ser Leu Pro Arg Cys Leu Gly Gln Met Phe Cys Ile Tyr Phe Leu

100

105

110

att gtc ttt gac tgc aac atc ctc ctg gtc atg gct cta gat cgc tat 683

Ile Val Phe Asp Cys Asn Ile Leu Leu Val Met Ala Leu Asp Arg Tyr

115

120

125

gtg gct atc tgc tac cct ctc cgc tac cca gaa ata gtg aca gga cag 731

Val Ala Ile Cys Tyr Pro Leu Arg Tyr Pro Glu Ile Val Thr Gly Gln

130

135

140

tta ctg gct ggt ctg gtg gtg ctg gca gtc acc agg agc aca agc att 779

Leu Leu Ala Gly Leu Val Val Leu Ala Val Thr Arg Ser Thr Ser Ile

145

150

155

gtt gct cca gtg gtg gtg ctg gcc tcg cgg gtt cgc ttc tgt cgc tca 827

Val Ala Pro Val Val Val Leu Ala Ser Arg Val Arg Phe Cys Arg Ser

160

165

170

175

gat gtg atc cgc cac ttt gcc tgt gag cac atg gcc ctg atg aag ctt 875

Asp Val Ile Arg His Phe Ala Cys Glu His Met Ala Leu Met Lys Leu

180

185

190

tcc tgt ggg gac atc tcg ctg aat aag acg gtg gga ctc act gtt cgc 923

Ser Cys Gly Asp Ile Ser Leu Asn Lys Thr Val Gly Leu Thr Val Arg

195

200

205

atc ttc aac cga gtc ctg gat atg ctc ctg tta ggt gcc tcc tac tcc 971  
Ile Phe Asn Arg Val Leu Asp Met Leu Leu Leu Gly Ala Ser Tyr Ser  
210 215 220

cgc atc atc cat gct gcc ttc agg atc tca tca ggt gga gca cgg tcc 1019  
Arg Ile Ile His Ala Ala Phe Arg Ile Ser Ser Gly Gly Ala Arg Ser  
225 230 235

aaa gcc ctg aac acc tgt ggc tcc cac ctg ctg gtc atc ttc acc gtc 1067  
Lys Ala Leu Asn Thr Cys Gly Ser His Leu Leu Val Ile Phe Thr Val  
240 245 250 255

tac tcc tcc acc atg tcc tca tcc att gtc tac cgt gtg gca cgc act 1115  
Tyr Ser Ser Thr Met Ser Ser Ser Ile Val Tyr Arg Val Ala Arg Thr  
260 265 270

gcc tcc caa gat gtg cac aac ttg ctt agt gct ttc tat ctg ttg ctc 1163  
Ala Ser Gln Asp Val His Asn Leu Leu Ser Ala Phe Tyr Leu Leu Leu  
275 280 285

ccc tgt ctg gtc aac ccc atc atc tac ggg gcc aga acc aag gaa atc 1211  
Pro Cys Leu Val Asn Pro Ile Ile Tyr Gly Ala Arg Thr Lys Glu Ile  
290 295 300

agg cag cac ctg gta gct ctg ttc caa agg act cag caa cag gtc ttc 1259  
Arg Gln His Leu Val Ala Leu Phe Gln Arg Thr Gln Gln Gln Val Phe  
305 310 315

act gag aag ccc cag tcc ctg ccc tcg aat aga gag ctt cct gga tga 1307



Thr Glu Lys Pro Gln Ser Leu Pro Ser Asn Arg Glu Leu Pro Gly  
 320 325 330

ttgtccagaa tttgtgggtc tcaaaatcac tticactatt cagtgaagga ggggcattca 1367  
 agtgggcatt cgctcttgtt atattttgtc tcggctatit tagttcagca tcctatttat 1427  
 gagaagggtc tattctatat ctccagctgt ctagaactcc ttaagtggcc caggatgacc 1487  
 tggaacccaa acaattctcc ttcttagtt tgccaaatgc tagcattaga ggcatgagtc 1547  
 acagtgcctg gcttatctgc actcactg gagagcctca tgtctgcttt caaaaagca 1607  
 cctactcact ctgaactagc aactgaaagc aagctctaac cctggcttga agtt 1661

<210> 32

<211> 334

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 32

Met Ser Gly Trp Ser Asn Gly Thr Tyr Asn Glu Ser Tyr Thr Ser Phe  
 1 5 10 15

Leu Leu Met Gly Phe Pro Gly Met Gln Glu Ala Arg Ala Leu Leu Val  
 20 25 30

Leu Pro Phe Leu Ser Leu Tyr Leu Val Ile Leu Phe Thr Asn Ala Leu  
35 40 45

Val Ile His Thr Val Ala Ser Gln Arg Ser Leu His Gln Pro Met Tyr  
50 55 60

Leu Leu Ile Ala Leu Leu Leu Ala Val Asn Ile Cys Ala Ala Thr Thr  
65 70 75 80

Val Val Pro Pro Met Leu Phe Ser Phe Ser Thr Arg Phe Asn Arg Ile  
85 90 95

Ser Leu Pro Arg Cys Leu Gly Gln Met Phe Cys Ile Tyr Phe Leu Ile  
100 105 110

Val Phe Asp Cys Asn Ile Leu Leu Val Met Ala Leu Asp Arg Tyr Val  
115 120 125

Ala Ile Cys Tyr Pro Leu Arg Tyr Pro Glu Ile Val Thr Gly Gln Leu  
130 135 140

Leu Ala Gly Leu Val Val Leu Ala Val Thr Arg Ser Thr Ser Ile Val  
145 150 155 160

Ala Pro Val Val Val Leu Ala Ser Arg Val Arg Phe Cys Arg Ser Asp  
165 170 175

Val Ile Arg His Phe Ala Cys Glu His Met Ala Leu Met Lys Leu Ser  
180 185 190

Cys Gly Asp Ile Ser Leu Asn Lys Thr Val Gly Leu Thr Val Arg Ile  
195 200 205

Phe Asn Arg Val Leu Asp Met Leu Leu Leu Gly Ala Ser Tyr Ser Arg  
210 215 220

Ile Ile His Ala Ala Phe Arg Ile Ser Ser Gly Gly Ala Arg Ser Lys  
225 230 235 240

Ala Leu Asn Thr Cys Gly Ser His Leu Leu Val Ile Phe Thr Val Tyr  
245 250 255

Ser Ser Thr Met Ser Ser Ser Ile Val Tyr Arg Val Ala Arg Thr Ala  
260 265 270

Ser Gln Asp Val His Asn Leu Leu Ser Ala Phe Tyr Leu Leu Leu Pro  
275 280 285

Cys Leu Val Asn Pro Ile Ile Tyr Gly Ala Arg Thr Lys Glu Ile Arg  
290 295 300

Gln His Leu Val Ala Leu Phe Gln Arg Thr Gln Gln Gln Val Phe Thr  
305 310 315 320

Glu Lys Pro Gln Ser Leu Pro Ser Asn Arg Glu Leu Pro Gly  
325 330

<210> 33  
<211> 1116  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<300>  
<308> AF121975  
<309> 1999-04-25  
<313> (1)..(1116)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (15)..(15)

&lt;223&gt; n is a, c, g, or t

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (50)..(1015)

&lt;400&gt; 33

caagctggct cttcntactg tctctccatt agtttttagtc gtcacggga atg aat tca 58

Met Asn Ser

1

aaa gca agc atg ctt gga act aac ttc act atc atc cat cca act gtg 106

Lys Ala Ser Met Leu Gly Thr Asn Phe Thr Ile Ile His Pro Thr Val

5

10

15

ttc atc ctg ctt gga atc cca ggg ctg gag cag tac cac acc tgg ctt 154

Phe Ile Leu Leu Gly Ile Pro Gly Leu Glu Gln Tyr His Thr Trp Leu

20

25

30

35

tct att cct ttt tgt ctt atg tac att gct gca gtc ttg ggg aac gga 202

Ser Ile Pro Phe Cys Leu Met Tyr Ile Ala Ala Val Leu Gly Asn Gly

40

45

50

gcc ctc atc ctt gtt gtc ctg agt gaa cgc acc ctc cat gag ccc atg 250

Ala Leu Ile Leu Val Val Leu Ser Glu Arg Thr Leu His Glu Pro Met  
                   55                                60                                65

tat gtc ttt ctg tcc atg ctg gct ggc act gat att ctc ctg tca acc 298  
 Tyr Val Phe Leu Ser Met Leu Ala Gly Thr Asp Ile Leu Leu Ser Thr  
                   70                                75                                80

acc act gtg cct aag acc ttg gct atc ttt tgg ttc cat gct ggg gag 346  
 Thr Thr Val Pro Lys Thr Leu Ala Ile Phe Trp Phe His Ala Gly Glu  
                   85                                90                                95

atc ccc ttt gat gcc tgc att gct cag atg ttt ttc atc cac gtt gct 394  
 Ile Pro Phe Asp Ala Cys Ile Ala Gln Met Phe Phe Ile His Val Ala  
 100                                105                                110                                115

ttt gtg gct gag tcg gga atc ctt ctg gcc atg gca ttt gac cga tat 442  
 Phe Val Ala Glu Ser Gly Ile Leu Leu Ala Met Ala Phe Asp Arg Tyr  
                                 120                                125                                130

gtg gct att tgt act cct ctg aga tac tca gcc gtc tta aca cct atg 490  
 Val Ala Ile Cys Thr Pro Leu Arg Tyr Ser Ala Val Leu Thr Pro Met  
                   135                                140                                145

gca att gga aaa atg acc ctg gcc atc tgg gga cgg agc att ggg aca 538  
 Ala Ile Gly Lys Met Thr Leu Ala Ile Trp Gly Arg Ser Ile Gly Thr  
                   150                                155                                160

att ttc cct atc ata ttt ctg ctg aag agg ctg tca tac tgc agg acc 586  
 Ile Phe Pro Ile Ile Phe Leu Leu Lys Arg Leu Ser Tyr Cys Arg Thr

165

170

175

aat gtc atc cca cac tca tat tgt gag cat att ggt gta gcc aga ttg 634

Asn Val Ile Pro His Ser Tyr Cys Glu His Ile Gly Val Ala Arg Leu

180

185

190

195

gct tgt gct gac atc act gtc aat atc tgg tat ggc ttc tcg gtg cca 682

Ala Cys Ala Asp Ile Thr Val Asn Ile Trp Tyr Gly Phe Ser Val Pro

200

205

210

atg gct tca gtt ttg gta gat gtt gca ctc att ggt att tct tat acg 730

Met Ala Ser Val Leu Val Asp Val Ala Leu Ile Gly Ile Ser Tyr Thr

215

220

225

ttg atc ctc cag gct gtg ttt aga ctt cct tcc cag gat gct agg cac 778

Leu Ile Leu Gln Ala Val Phe Arg Leu Pro Ser Gln Asp Ala Arg His

230

235

240

aag gcc ctc aat acc tgt ggt tct cac att ggg gtc att ctc ctc ttt 826

Lys Ala Leu Asn Thr Cys Gly Ser His Ile Gly Val Ile Leu Leu Phe

245

250

255

ttc ata cca tca ttt ttt act ttc ctt act cat cgc ttt ggc aag aac 874

Phe Ile Pro Ser Phe Phe Thr Phe Leu Thr His Arg Phe Gly Lys Asn

260

265

270

275

atc ccc cac cat gtg cac att ctt ctg gca aat ctc tat gtg ttg gtt 922

Ile Pro His His Val His Ile Leu Leu Ala Asn Leu Tyr Val Leu Val

280

285

290

.ccc ccc atg ctt aac cct atc atc tat ggt gct aag acc aag caa att 970

Pro Pro Met Leu Asn Pro Ile Ile Tyr Gly Ala Lys Thr Lys Gln Ile

295

300

305

agg gac agc atg act cgc atg ttg tct gtt gtg tgg aag tct tga 1015

Arg Asp Ser Met Thr Arg Met Leu Ser Val Val Trp Lys Ser

310

315

320

gagcagtcac agttcacaaa gctgtccttag tttctcttac aaacaggaga gagagagaga 1075

gagagagaga gagagagaga gagagagaga gagagagaga g 1116

<210> 34

<211> 321

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 34

Met Asn Ser Lys Ala Ser Met Leu Gly Thr Asn Phe Thr Ile Ile His

1

5

10

15

Pro Thr Val Phe Ile Leu Leu Gly Ile Pro Gly Leu Glu Gln Tyr His

20

25

30



Thr Trp Leu Ser Ile Pro Phe Cys Leu Met Tyr Ile Ala Ala Val Leu  
35 40 45

Gly Asn Gly Ala Leu Ile Leu Val Val Leu Ser Glu Arg Thr Leu His  
50 55 60

Glu Pro Met Tyr Val Phe Leu Ser Met Leu Ala Gly Thr Asp Ile Leu  
65 70 75 80

Leu Ser Thr Thr Thr Val Pro Lys Thr Leu Ala Ile Phe Trp Phe His  
85 90 95

Ala Gly Glu Ile Pro Phe Asp Ala Cys Ile Ala Gln Met Phe Phe Ile  
100 105 110

His Val Ala Phe Val Ala Glu Ser Gly Ile Leu Leu Ala Met Ala Phe  
115 120 125

Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys Thr Pro Leu Arg Tyr Ser Ala Val Leu  
130 135 140

Thr Pro Met Ala Ile Gly Lys Met Thr Leu Ala Ile Trp Gly Arg Ser

145                      150                      155                      160

Ile Gly Thr Ile Phe Pro Ile Ile Phe Leu Leu Lys Arg Leu Ser Tyr  
                         165                      170                      175

Cys Arg Thr Asn Val Ile Pro His Ser Tyr Cys Glu His Ile Gly Val  
                         180                      185                      190

Ala Arg Leu Ala Cys Ala Asp Ile Thr Val Asn Ile Trp Tyr Gly Phe  
                         195                      200                      205

Ser Val Pro Met Ala Ser Val Leu Val Asp Val Ala Leu Ile Gly Ile  
                         210                      215                      220

Ser Tyr Thr Leu Ile Leu Gln Ala Val Phe Arg Leu Pro Ser Gln Asp  
225                      230                      235                      240

Ala Arg His Lys Ala Leu Asn Thr Cys Gly Ser His Ile Gly Val Ile  
                         245                      250                      255

Leu Leu Phe Phe Ile Pro Ser Phe Phe Thr Phe Leu Thr His Arg Phe  
                         260                      265                      270

Gly Lys Asn Ile Pro His His Val His Ile Leu Leu Ala Asn Leu Tyr

275

280

285

Val Leu Val Pro Pro Met Leu Asn Pro Ile Ile Tyr Gly Ala Lys Thr

290

295

300

Lys Gln Ile Arg Asp Ser Met Thr Arg Met Leu Ser Val Val Trp Lys

305

310

315

320

Ser

<210> 35

<211> 1267

<212> DNA

<213> Mus musculus

<300>

<308> AF121977

<309> 1999-04-25

<313> (1)..(1267)

<220>

<221> misc\_feature

<222> (108)..(108)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> CDS

<222> (172)..(1200)

<400> 35

tctattgctc actgaaatat aaactagcaa catgaagaac atatgattga actatatcaa 60

agaaacaaat ttttctaata ataatgacc atgaatcatt gaatttcnta agctgaagtt 120

ctttcatgag gtaccacaca acagcatgtt cctgtacaca tgtaactacc t atg ttt 177

Met Phe

1

tgt cat tta tat aat gag aac aat atg caa gtg gca atc ctg gat tcc 225

Cys His Leu Tyr Asn Glu Asn Asn Met Gln Val Ala Ile Leu Asp Ser

5

10

15

att cta ata cct tct tat ttt tct ttc ctg aca gag atg gag cct gga 273

Ile Leu Ile Pro Ser Tyr Phe Ser Phe Leu Thr Glu Met Glu Pro Gly

20

25

30

aac tac aca gtt gta aca gaa ttc att ctt tta ggg tta aca gat gat 321

Asn Tyr Thr Val Val Thr Glu Phe Ile Leu Leu Gly Leu Thr Asp Asp

35

40

45

50

att aca gtc agt gtc att tta ttt gtt atg ttt cta atc gtc tat tct 369

Ile Thr Val Ser Val Ile Leu Phe Val Met Phe Leu Ile Val Tyr Ser

55

60

65

gtt act tta atg ggt aac ttg aac ata att gtg cta atc aga acc agc 417

Val Thr Leu Met Gly Asn Leu Asn Ile Ile Val Leu Ile Arg Thr Ser

70

75

80

cct cag ctt cac acc ccc atg tac ctt ttc ctt agc cat ttg gcc ttt 465

Pro Gln Leu His Thr Pro Met Tyr Leu Phe Leu Ser His Leu Ala Phe

85

90

95

cta gac att ggg tac tcc agc tca gtt aca ccc atc atg ctg agg ggc 513

Leu Asp Ile Gly Tyr Ser Ser Ser Val Thr Pro Ile Met Leu Arg Gly

100

105

110

ttt ctc aga aag gga aca ttt atc cct gtg gct ggc tgt gtg gct caa 561

Phe Leu Arg Lys Gly Thr Phe Ile Pro Val Ala Gly Cys Val Ala Gln

115

120

125

130

ctc tgt att gtg gtg gca ttt ggg aca tct gaa tct ttc ttg cta gct 609

Leu Cys Ile Val Val Ala Phe Gly Thr Ser Glu Ser Phe Leu Leu Ala

135

140

145

tcc atg gcc tat gac cgc tat gtg gcc atc tgc tca cct ttg ctc tac 657

Ser Met Ala Tyr Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys Ser Pro Leu Leu Tyr

150

155

160

tca aca cag atg tcc tcc aca gtc tgc atc ctc cta gtt gga act tcc 705  
Ser Thr Gln Met Ser Ser Thr Val Cys Ile Leu Leu Val Gly Thr Ser  
165 170 175

tac cta ggt gga tgg gtg aat gct tgg ata ttt act ggt tgc tcc tta 753  
Tyr Leu Gly Gly Trp Val Asn Ala Trp Ile Phe Thr Gly Cys Ser Leu  
180 185 190

aat ctg tca ttt tgt ggg cca aat aaa att aat cac ttt ttc tgt gac 801  
Asn Leu Ser Phe Cys Gly Pro Asn Lys Ile Asn His Phe Phe Cys Asp  
195 200 205 210

tat tca cca cta ttg aag ctt tct tgt tct cat gac ttt tct ttt gaa 849  
Tyr Ser Pro Leu Leu Lys Leu Ser Cys Ser His Asp Phe Ser Phe Glu  
215 220 225

gtc att cca gca atc tct tcg gga tcc atc att gtg gtc act gtg ttt 897  
Val Ile Pro Ala Ile Ser Ser Gly Ser Ile Ile Val Val Thr Val Phe  
230 235 240

atc att gct ctg tct tat gtc tac atc ctt gtg tca atc ctg aag atg 945  
Ile Ile Ala Leu Ser Tyr Val Tyr Ile Leu Val Ser Ile Leu Lys Met  
245 250 255

cgc tct act gaa ggt cgc cag aag gcc ttc tcc acc tgc act tcc cac 993  
Arg Ser Thr Glu Gly Arg Gln Lys Ala Phe Ser Thr Cys Thr Ser His  
260 265 270

ctc act gca gtc act ctg ttc ttt ggg acc atc aca ttc att tat gtg 1041

Leu Thr Ala Val Thr Leu Phe Phe Gly Thr Ile Thr Phe Ile Tyr Val  
 275 280 285 290

atg ccc cag tcc agc tac tcc aca gac cag aac aaa gtg gtg tct gtg 1089  
 Met Pro Gln Ser Ser Tyr Ser Thr Asp Gln Asn Lys Val Val Ser Val  
 295 300 305

ttt tac aca gtg gtg atc ccc atg ttg aat ccc ctc atc tac agt ttc 1137  
 Phe Tyr Thr Val Val Ile Pro Met Leu Asn Pro Leu Ile Tyr Ser Phe  
 310 315 320

aga aac aaa gag gtt aaa gaa gcc atg aaa aaa ctg att gct aaa aca 1185  
 Arg Asn Lys Glu Val Lys Glu Ala Met Lys Lys Leu Ile Ala Lys Thr  
 325 330 335

cat tgg tgg tcc tga aatatttgaa ttacaaaca gtaaattctg ctcttacagg 1240  
 His Trp Trp Ser  
 340

taaatggcag tataactaagt aaattac 1267

<210> 36

<211> 342

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 36

Met Phe Cys His Leu Tyr Asn Glu Asn Asn Met Gln Val Ala Ile Leu

1 5 10 15

Asp Ser Ile Leu Ile Pro Ser Tyr Phe Ser Phe Leu Thr Glu Met Glu

20 25 30

Pro Gly Asn Tyr Thr Val Val Thr Glu Phe Ile Leu Leu Gly Leu Thr

35 40 45

Asp Asp Ile Thr Val Ser Val Ile Leu Phe Val Met Phe Leu Ile Val

50 55 60

Tyr Ser Val Thr Leu Met Gly Asn Leu Asn Ile Ile Val Leu Ile Arg

65 70 75 80

Thr Ser Pro Gln Leu His Thr Pro Met Tyr Leu Phe Leu Ser His Leu

85 90 95

Ala Phe Leu Asp Ile Gly Tyr Ser Ser Ser Val Thr Pro Ile Met Leu

100 105 110

Arg Gly Phe Leu Arg Lys Gly Thr Phe Ile Pro Val Ala Gly Cys Val



115

120

125

Ala Gln Leu Cys Ile Val Val Ala Phe Gly Thr Ser Glu Ser Phe Leu

130

135

140

Leu Ala Ser Met Ala Tyr Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys Ser Pro Leu

145

150

155

160

Leu Tyr Ser Thr Gln Met Ser Ser Thr Val Cys Ile Leu Leu Val Gly

165

170

175

Thr Ser Tyr Leu Gly Gly Trp Val Asn Ala Trp Ile Phe Thr Gly Cys

180

185

190

Ser Leu Asn Leu Ser Phe Cys Gly Pro Asn Lys Ile Asn His Phe Phe

195

200

205

Cys Asp Tyr Ser Pro Leu Leu Lys Leu Ser Cys Ser His Asp Phe Ser

210

215

220

Phe Glu Val Ile Pro Ala Ile Ser Ser Gly Ser Ile Ile Val Val Thr

225

230

235

240

Val Phe Ile Ile Ala Leu Ser Tyr Val Tyr Ile Leu Val Ser Ile Leu

245

250

255

Lys Met Arg Ser Thr Glu Gly Arg Gln Lys Ala Phe Ser Thr Cys Thr

260

265

270

Ser His Leu Thr Ala Val Thr Leu Phe Phe Gly Thr Ile Thr Phe Ile

275

280

285

Tyr Val Met Pro Gln Ser Ser Tyr Ser Thr Asp Gln Asn Lys Val Val

290

295

300

Ser Val Phe Tyr Thr Val Val Ile Pro Met Leu Asn Pro Leu Ile Tyr

305

310

315

320

Ser Phe Arg Asn Lys Glu Val Lys Glu Ala Met Lys Lys Leu Ile Ala

325

330

335

Lys Thr His Trp Trp Ser

340

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 1120

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;300&gt;

&lt;308&gt; AF121979

&lt;309&gt; 1999-04-25

&lt;313&gt; (1).. (1120)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (84).. (1040)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (940).. (940)

&lt;223&gt; n is a, c, g, or t

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1083).. (1083)

&lt;223&gt; n is a, c, g, or t

&lt;400&gt; 37

tgtcattatt agtgctgata aagtgttgtc aagtcctgtg agattccttc aaatgaatat 60

gtccatcaga ggctcctgac aac atg tca cca ggc aac agc tca tgg att cat 113

Met Ser Pro Gly Asn Ser Ser Trp Ile His

1 5 10

cct tct tcc ttc ctg ctc ttg gga atc cca gga ctg gaa gag ttg cag 161

Pro Ser Ser Phe Leu Leu Leu Gly Ile Pro Gly Leu Glu Glu Leu Gln

15 20 25

ttc tgg ctt ggt ttg cca ttt gga aca gtc tat ctt att gct gtc cta 209

Phe Trp Leu Gly Leu Pro Phe Gly Thr Val Tyr Leu Ile Ala Val Leu

30 35 40

ggg aat gtc atc att ctc ttt gta atc tat cta gag cac agc ctt cac 257

Gly Asn Val Ile Ile Leu Phe Val Ile Tyr Leu Glu His Ser Leu His

45 50 55

caa cct atg ttc tac tta ctg gcc ata ctg gct gtt act gac ttg ggt 305

Gln Pro Met Phe Tyr Leu Leu Ala Ile Leu Ala Val Thr Asp Leu Gly

60 65 70

ctg tct aca gca act gtt ccc aga gca ctc ggt ata ttc tgg ttt ggc 353

Leu Ser Thr Ala Thr Val Pro Arg Ala Leu Gly Ile Phe Trp Phe Gly

75 80 85 90

ttc cat aag att gcc ttt agg gac tgt gta gct caa atg ttt ttc ata 401

Phe His Lys Ile Ala Phe Arg Asp Cys Val Ala Gln Met Phe Phe Ile

95	100	105	
cat ctg ttt aca ggc atc gaa aca ttc atg ctt gta gct atg gcc ttt			449
His Leu Phe Thr Gly Ile Glu Thr Phe Met Leu Val Ala Met Ala Phe			
110	115	120	
gat cgc tac att gcc atc tgt aac cct ctc cga tat aac act atc ctc			497
Asp Arg Tyr Ile Ala Ile Cys Asn Pro Leu Arg Tyr Asn Thr Ile Leu			
125	130	135	
acc aac aga aca atc tgc att att gtt gga gtt gga cta ttt aaa aat			545
Thr Asn Arg Thr Ile Cys Ile Ile Val Gly Val Gly Leu Phe Lys Asn			
140	145	150	
ttc att ttg gtt ttt cca ctt ata ttt ctc att cta agg ctt tca ttc			593
Phe Ile Leu Val Phe Pro Leu Ile Phe Leu Ile Leu Arg Leu Ser Phe			
155	160	165	170
tgt gga cac aat atc ata cca cac aca tac tgt gag cac atg ggc att			641
Cys Gly His Asn Ile Ile Pro His Thr Tyr Cys Glu His Met Gly Ile			
175	180	185	
gct cga ctg gca tgc gtc agc atc aag gtt aat gta tta ttt gga tta			689
Ala Arg Leu Ala Cys Val Ser Ile Lys Val Asn Val Leu Phe Gly Leu			
190	195	200	
ata ctc ata tct atg ata ctt ctg gat gtt gtt ttg agt gct ctg tcc			737
Ile Leu Ile Ser Met Ile Leu Leu Asp Val Val Leu Ser Ala Leu Ser			
205	210	215	

tat gcg aaa att ctt cat gct gta ttt aaa ctc cca tcc tgg gaa gcc 785  
Tyr Ala Lys Ile Leu His Ala Val Phe Lys Leu Pro Ser Trp Glu Ala  
220 225 230

aga ctc aaa gct ctt aat acc tgt ggt tcc cat gtg tgt gtg atc ttg 833  
Arg Leu Lys Ala Leu Asn Thr Cys Gly Ser His Val Cys Val Ile Leu  
235 240 245 250

gct ttc ttc act cca gcc ttt ttc tcc ttc ttg act cat cga ttt gga 881  
Ala Phe Phe Thr Pro Ala Phe Phe Ser Phe Leu Thr His Arg Phe Gly  
255 260 265

cac aat att cca cga tat atc cac atc ctc ctt gct aac tta tat gtg 929  
His Asn Ile Pro Arg Tyr Ile His Ile Leu Leu Ala Asn Leu Tyr Val  
270 275 280

atc att ccc cng gct ctt aac cct att att tat ggg gtg aga acc aaa 977  
Ile Ile Pro Xaa Ala Leu Asn Pro Ile Ile Tyr Gly Val Arg Thr Lys  
285 290 295

cag ata caa gat cgt gcg gtg aca ata ttg tgc aac gag gtt gga cag 1025  
Gln Ile Gln Asp Arg Ala Val Thr Ile Leu Cys Asn Glu Val Gly Gln  
300 305 310

ctg gca gac gac tag tatgtcttct aatagtctct ttccttccta agaggactac 1080  
Leu Ala Asp Asp

315

tgntttgtaa gcttgcatatc gtggaacaca ttacacaatg

1120

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 318

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (286)..(286)

&lt;223&gt; The 'Xaa' at location 286 stands for Gln, Arg, Pro, or Leu.

&lt;400&gt; 38

Met Ser Pro Gly Asn Ser Ser Trp Ile His Pro Ser Ser Phe Leu Leu  
1 5 10 15

Leu Gly Ile Pro Gly Leu Glu Glu Leu Gln Phe Trp Leu Gly Leu Pro  
20 25 30

Phe Gly Thr Val Tyr Leu Ile Ala Val Leu Gly Asn Val Ile Ile Leu  
35 40 45

Phe Val Ile Tyr Leu Glu His Ser Leu His Gln Pro Met Phe Tyr Leu  
50 55 60

Leu Ala Ile Leu Ala Val Thr Asp Leu Gly Leu Ser Thr Ala Thr Val  
65 70 75 80

Pro Arg Ala Leu Gly Ile Phe Trp Phe Gly Phe His Lys Ile Ala Phe  
85 90 95

Arg Asp Cys Val Ala Gln Met Phe Phe Ile His Leu Phe Thr Gly Ile  
100 105 110

Glu Thr Phe Met Leu Val Ala Met Ala Phe Asp Arg Tyr Ile Ala Ile  
115 120 125

Cys Asn Pro Leu Arg Tyr Asn Thr Ile Leu Thr Asn Arg Thr Ile Cys  
130 135 140

Ile Ile Val Gly Val Gly Leu Phe Lys Asn Phe Ile Leu Val Phe Pro  
145 150 155 160

Leu Ile Phe Leu Ile Leu Arg Leu Ser Phe Cys Gly His Asn Ile Ile



165

170

175

Pro His Thr Tyr Cys Glu His Met Gly Ile Ala Arg Leu Ala Cys Val

180

185

190

Ser Ile Lys Val Asn Val Leu Phe Gly Leu Ile Leu Ile Ser Met Ile

195

200

205

Leu Leu Asp Val Val Leu Ser Ala Leu Ser Tyr Ala Lys Ile Leu His

210

215

220

Ala Val Phe Lys Leu Pro Ser Trp Glu Ala Arg Leu Lys Ala Leu Asn

225

230

235

240

Thr Cys Gly Ser His Val Cys Val Ile Leu Ala Phe Phe Thr Pro Ala

245

250

255

Phe Phe Ser Phe Leu Thr His Arg Phe Gly His Asn Ile Pro Arg Tyr

260

265

270

Ile His Ile Leu Leu Ala Asn Leu Tyr Val Ile Ile Pro Xaa Ala Leu

275

280

285

Asn Pro Ile Ile Tyr Gly Val Arg Thr Lys Gln Ile Gln Asp Arg Ala

290

295

300

Val Thr Ile Leu Cys Asn Glu Val Gly Gln Leu Ala Asp Asp

305

310

315

<210> 39

<211> 2333

<212> DNA

<213> Mus musculus

<300>

<308> M36778

<309> 1995-08-22

<313> (1)..(2333)

<220>

<221> CDS

<222> (24)..(1088)

<400> 39

gctgtggcag ggaaggggcc acc atg gga tgt acg ctg agc gca gag gag aga 53

Met Gly Cys Thr Leu Ser Ala Glu Glu Arg

1

5

10

gcc gcc ctc gag cgg agc aag gcg att gag aaa aac ctc aaa gaa gat 101  
Ala Ala Leu Glu Arg Ser Lys Ala Ile Glu Lys Asn Leu Lys Glu Asp  
15 20 25

ggc atc agc gcc gcc aaa gac gtg aaa tta ctc ctg ctg ggg gct gga 149  
Gly Ile Ser Ala Ala Lys Asp Val Lys Leu Leu Leu Leu Gly Ala Gly  
30 35 40

gaa tca gga aaa agc acc att gtg aag cag atg aag atc atc cat gaa 197  
Glu Ser Gly Lys Ser Thr Ile Val Lys Gln Met Lys Ile Ile His Glu  
45 50 55

gat ggc ttc tct ggg gaa gac gtg aag cag tac aag cct gtg gtc tac 245  
Asp Gly Phe Ser Gly Glu Asp Val Lys Gln Tyr Lys Pro Val Val Tyr  
60 65 70

agc aac acc atc cag tct ctg gcg gcc att gtc cgg gcc atg gac act 293  
Ser Asn Thr Ile Gln Ser Leu Ala Ala Ile Val Arg Ala Met Asp Thr  
75 80 85 90

ttg ggc gtg gag tat ggt gac aag gag agg aag acg gac tcc aag atg 341  
Leu Gly Val Glu Tyr Gly Asp Lys Glu Arg Lys Thr Asp Ser Lys Met  
95 100 105

gtg tgt gac gtg gtg agt cgt atg gaa gac act gaa ccg ttc tct gca 389  
Val Cys Asp Val Val Ser Arg Met Glu Asp Thr Glu Pro Phe Ser Ala  
110 115 120

gaa ctt ctt tct gcc atg atg cga ctc tgg ggc gac tcg ggg atc cag 437

Glu Leu Leu Ser Ala Met Met Arg Leu Trp Gly Asp Ser Gly Ile Gln  
 125 130 135

gag tgc ttc aac cga tct cgg gag tat cag ctc aat gac tct gcc aaa 485  
 Glu Cys Phe Asn Arg Ser Arg Glu Tyr Gln Leu Asn Asp Ser Ala Lys  
 140 145 150

tac tac ctg gac agc ctg gat cgg att gga gcc ggt gac tac cag ccc 533  
 Tyr Tyr Leu Asp Ser Leu Asp Arg Ile Gly Ala Gly Asp Tyr Gln Pro  
 155 160 165 170

act gag cag gac atc ctc cga acc aga gtc aaa aca act ggc atc gta 581  
 Thr Glu Gln Asp Ile Leu Arg Thr Arg Val Lys Thr Thr Gly Ile Val  
 175 180 185

gaa acc cac ttc acc ttc aag aac ctc cac ttc agg ctg ttt gac gtc 629  
 Glu Thr His Phe Thr Phe Lys Asn Leu His Phe Arg Leu Phe Asp Val  
 190 195 200

ggg ggc cag cga tct gaa cgc aag aag tgg atc cac tgc ttt gag gat 677  
 Gly Gly Gln Arg Ser Glu Arg Lys Lys Trp Ile His Cys Phe Glu Asp  
 205 210 215

gtc acg gcc atc atc ttc tgt gtc gca ctc agc ggc tat gac cag gtg 725  
 Val Thr Ala Ile Ile Phe Cys Val Ala Leu Ser Gly Tyr Asp Gln Val  
 220 225 230

ctc cac gag gac gaa acc acg aac cgc atg cac gaa tcc ctg aag ctc 773  
 Leu His Glu Asp Glu Thr Thr Asn Arg Met His Glu Ser Leu Lys Leu

235	240	245	250	
ttc gac agc atc tgc aac aac aag tgg ttc aca gac aca tct att atc Phe Asp Ser Ile Cys Asn Asn Lys Trp Phe Thr Asp Thr Ser Ile Ile				821
	255	260	265	
ctg ttt ctc aac aag aag gac ata ttt gag gag aag atc aag aag tcc Leu Phe Leu Asn Lys Lys Asp Ile Phe Glu Glu Lys Ile Lys Lys Ser				869
	270	275	280	
cca ctc acc atc tgc ttt cct gaa tac aca ggc ccc agt gcc ttc aca Pro Leu Thr Ile Cys Phe Pro Glu Tyr Thr Gly Pro Ser Ala Phe Thr				917
	285	290	295	
gaa gct gtg gct cac atc caa ggg cag tat gag agt aag aat aag tca Glu Ala Val Ala His Ile Gln Gly Gln Tyr Glu Ser Lys Asn Lys Ser				965
	300	305	310	
gct cac aag gaa gtc tac agc cat gtc acc tgt gcc acg gac acc aac Ala His Lys Glu Val Tyr Ser His Val Thr Cys Ala Thr Asp Thr Asn				1013
315	320	325	330	
aac atc caa ttc gtc ttt gat gcc gtg aca gat gtc atc atc gcc aaa Asn Ile Gln Phe Val Phe Asp Ala Val Thr Asp Val Ile Ile Ala Lys				1061
	335	340	345	
aac cta cgg ggc tgt gga ctc tac tga gccctggcct cctacccagc Asn Leu Arg Gly Cys Gly Leu Tyr				1108
	350			

ctgccactca ctccctcccct ggaccagag ctctgtcact gctcagatgc cctgttaact 1168

gaagaaaacc tggaggctag ccttgggggc aggaggaggc atcctttgag catccccacc 1228

ccaccaact tcagcctcgt gacacgtggg aacagggttg ggcagaggtg tggaacagca 1288

caaggccaga gaccacggca tgccacttgg gtgctgtcct ctggtcagct gtgtgtctta 1348

cacagaggcc gagtgggcaa cactgccatc tgattcagaa tgggcatgcc ctgtcctctg 1408

taccttttgt tcagtgtcct gggtttctctt ccaccttggg gataggatgg ctggcaggaa 1468

ggcccatgg aaggtgctgc ttgattaggg gatagtcgat ggcactcttc agcagtcctc 1528

agggtctgtt tggtagaggg tggtttcgtc gacaaaagcc aacatggaat caggccactt 1588

ttggggcgca aagactcaga ctttggggac gggttccctc ctcttcact ttggatcttg 1648

gcccctctct ggtcatcttc ccttgccctt gggctcccca ggatactcag ccctgactcc 1708

catgggggttg ggaatattcc ttaagactgg ctgactgcaa aggtcaccga tggagaaaca 1768

tccctgtgct acagaattgg ggggtgggaca gctgaggggg caggcggctc tttcctgata 1828

gttgatgaca agccctgaga atgccatctg ctggctccac tcacacgggc tcaactgtcc 1888

tgggtgatag tgacttgcca ggccacaggc tgcaggtcac agacagagca ggcaagcagc 1948

cttgcaactg cagattactt agggagaagc atcggggcct cgtgagccag gccccgtagc 2008  
cagtgcctg ctttactcca gccttgggtca ggaagtcgaa agcccttgggt gtattcctgg 2068  
tctcggagca aataatgagc cagcacctg aagggtgggc tccaactcag acatgcagcc 2128  
agccccctag gtgggtaaac gccctaggga cctagggaga gcctttgctg cagagattcc 2188  
taagcaaaac ggcgtggtgg agctttggca accctagccc cagctaactt tggacagtca 2248  
gcatatgtcc ctgccatccc tagacatctc cagtcagctg gtatcacagc cagtggttca 2308  
gacaggtttg aatgctcatg tggca 2333

<210> 40

<211> 354

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 40

Met Gly Cys Thr Leu Ser Ala Glu Glu Arg Ala Ala Leu Glu Arg Ser

1 5 10 15

Lys Ala Ile Glu Lys Asn Leu Lys Glu Asp Gly Ile Ser Ala Ala Lys

20 25 30

Asp Val Lys Leu Leu Leu Leu Gly Ala Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr

35

40

45

Ile Val Lys Gln Met Lys Ile Ile His Glu Asp Gly Phe Ser Gly Glu

50

55

60

Asp Val Lys Gln Tyr Lys Pro Val Val Tyr Ser Asn Thr Ile Gln Ser

65

70

75

80

Leu Ala Ala Ile Val Arg Ala Met Asp Thr Leu Gly Val Glu Tyr Gly

85

90

95

Asp Lys Glu Arg Lys Thr Asp Ser Lys Met Val Cys Asp Val Val Ser

100

105

110

Arg Met Glu Asp Thr Glu Pro Phe Ser Ala Glu Leu Leu Ser Ala Met

115

120

125

Met Arg Leu Trp Gly Asp Ser Gly Ile Gln Glu Cys Phe Asn Arg Ser

130

135

140



Arg Glu Tyr Gln Leu Asn Asp Ser Ala Lys Tyr Tyr Leu Asp Ser Leu  
145 150 155 160

Asp Arg Ile Gly Ala Gly Asp Tyr Gln Pro Thr Glu Gln Asp Ile Leu  
165 170 175

Arg Thr Arg Val Lys Thr Thr Gly Ile Val Glu Thr His Phe Thr Phe  
180 185 190

Lys Asn Leu His Phe Arg Leu Phe Asp Val Gly Gly Gln Arg Ser Glu  
195 200 205

Arg Lys Lys Trp Ile His Cys Phe Glu Asp Val Thr Ala Ile Ile Phe  
210 215 220

Cys Val Ala Leu Ser Gly Tyr Asp Gln Val Leu His Glu Asp Glu Thr  
225 230 235 240

Thr Asn Arg Met His Glu Ser Leu Lys Leu Phe Asp Ser Ile Cys Asn  
245 250 255

Asn Lys Trp Phe Thr Asp Thr Ser Ile Ile Leu Phe Leu Asn Lys Lys  
260 265 270

Asp Ile Phe Glu Glu Lys Ile Lys Lys Ser Pro Leu Thr Ile Cys Phe  
275 280 285

Pro Glu Tyr Thr Gly Pro Ser Ala Phe Thr Glu Ala Val Ala His Ile  
290 295 300

Gln Gly Gln Tyr Glu Ser Lys Asn Lys Ser Ala His Lys Glu Val Tyr  
305 310 315 320

Ser His Val Thr Cys Ala Thr Asp Thr Asn Asn Ile Gln Phe Val Phe  
325 330 335

Asp Ala Val Thr Asp Val Ile Ile Ala Lys Asn Leu Arg Gly Cys Gly  
340 345 350

Leu Tyr

<210> 41

&lt;211&gt; 1135

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;300&gt;

&lt;308&gt; M87286

&lt;309&gt; 1993-04-27

&lt;313&gt; (1)..(1135)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (41)..(1063)

&lt;400&gt; 41

gctcttcact tgagacgcct gagggaaacc accaggcagg atg agc gag ctg gag 55

Met Ser Glu Leu Glu

1 5

cag ctg agg cag gag gct gaa cag ctt cgg aat cag atc cag gat gct 103

Gln Leu Arg Gln Glu Ala Glu Gln Leu Arg Asn Gln Ile Gln Asp Ala

10 15 20

cgg aag gcc tgc aac gat gcc acg ctg gtt cag atc acg tct aat atg 151

Arg Lys Ala Cys Asn Asp Ala Thr Leu Val Gln Ile Thr Ser Asn Met

25 30 35

gac tcc gtg ggc cga ata caa atg cga aca agg cgc acg ctg cgt ggc 199

Asp Ser Val Gly Arg Ile Gln Met Arg Thr Arg Arg Thr Leu Arg Gly

40

45

50

cac ctc gct aag atc tac gcc atg cac tgg gga tat gat tcc agg cta 247  
His Leu Ala Lys Ile Tyr Ala Met His Trp Gly Tyr Asp Ser Arg Leu

55

60

65

cta gtc agt gct tcg caa gat gga aaa tta att att tgg gat agc tat 295  
Leu Val Ser Ala Ser Gln Asp Gly Lys Leu Ile Ile Trp Asp Ser Tyr

70

75

80

85

acg aca aat aag atg cac gcc atc cct ctg agg tcc tcc tgg gtg atg 343  
Thr Thr Asn Lys Met His Ala Ile Pro Leu Arg Ser Ser Trp Val Met

90

95

100

acc tgt gcc tac gcc ccg tcc ggg aac tac gtt gcc tgt gga ggc ttg 391  
Thr Cys Ala Tyr Ala Pro Ser Gly Asn Tyr Val Ala Cys Gly Gly Leu

105

110

115

gat aac atc tgc tcc ata tac aac cta aag acc cga gag gga gat gtg 439  
Asp Asn Ile Cys Ser Ile Tyr Asn Leu Lys Thr Arg Glu Gly Asp Val

120

125

130

cgg gtg agc cga gaa ttg gca gga cac acg ggc tac ttg tcc tgc tgc 487  
Arg Val Ser Arg Glu Leu Ala Gly His Thr Gly Tyr Leu Ser Cys Cys

135

140

145

cga ttc tta gat gat gga caa atc att aca agt tcg gga gac acg act 535  
Arg Phe Leu Asp Asp Gly Gln Ile Ile Thr Ser Ser Gly Asp Thr Thr

150

155

160

165

tgt gct ttg tgg gac att gag acc gga cag cag act acg acc ttc aca 583  
Cys Ala Leu Trp Asp Ile Glu Thr Gly Gln Gln Thr Thr Thr Phe Thr  
170 175 180

gga cac tcg ggt gac gtg atg agc ctc tca ctg agt cct gac ttg aag 631  
Gly His Ser Gly Asp Val Met Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Leu Lys  
185 190 195

acg ttt gtg tct ggt gct tgt gat gca tcc tca aag ctg tgg gat atc 679  
Thr Phe Val Ser Gly Ala Cys Asp Ala Ser Ser Lys Leu Trp Asp Ile  
200 205 210

cga gat ggg atg tgt aga cag tct ttc acc gga cac atc tca gac atc 727  
Arg Asp Gly Met Cys Arg Gln Ser Phe Thr Gly His Ile Ser Asp Ile  
215 220 225

aac gct gtc agt ttc ttc ccg agt gga tat gcc ttt gcc act ggt tct 775  
Asn Ala Val Ser Phe Phe Pro Ser Gly Tyr Ala Phe Ala Thr Gly Ser  
230 235 240 245

gat gat gcc aca tgc cga ctc ttt gac ctc cgt gca gac cag gag ctc 823  
Asp Asp Ala Thr Cys Arg Leu Phe Asp Leu Arg Ala Asp Gln Glu Leu  
250 255 260

ctg cta tac tct cat gac aat atc atc tgt ggc att act tct gtg gcc 871  
Leu Leu Tyr Ser His Asp Asn Ile Ile Cys Gly Ile Thr Ser Val Ala  
265 270 275

ttc tca aag agt ggg cgc ctc ctg tta gcc ggc tat gac gac ttc aac 919  
Phe Ser Lys Ser Gly Arg Leu Leu Leu Ala Gly Tyr Asp Asp Phe Asn  
280 285 290

tgc agt gtg tgg gac gct ctg aaa gga ggc cgg tca ggt gtc ctt gct 967  
Cys Ser Val Trp Asp Ala Leu Lys Gly Gly Arg Ser Gly Val Leu Ala  
295 300 305

ggt cat gac aac cgt gtt agc tgc tta ggt gtg act gat gac ggc atg 1015  
Gly His Asp Asn Arg Val Ser Cys Leu Gly Val Thr Asp Asp Gly Met  
310 315 320 325

gct gtg gcc act ggc tcc tgg gac agt ttt ctt aga atc tgg aat tga 1063  
Ala Val Ala Thr Gly Ser Trp Asp Ser Phe Leu Arg Ile Trp Asn  
330 335 340

gtgccatatt ttctgttctc caatgatacc tggagaaatc cgtgttacag cctatagctg 1123

tgaggaaaaa aa 1135

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 340

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 42

Met Ser Glu Leu Glu Gln Leu Arg Gln Glu Ala Glu Gln Leu Arg Asn

1                      5                      10                      15

Gln Ile Gln Asp Ala Arg Lys Ala Cys Asn Asp Ala Thr Leu Val Gln  
20                      25                      30

Ile Thr Ser Asn Met Asp Ser Val Gly Arg Ile Gln Met Arg Thr Arg  
35                      40                      45

Arg Thr Leu Arg Gly His Leu Ala Lys Ile Tyr Ala Met His Trp Gly  
50                      55                      60

Tyr Asp Ser Arg Leu Leu Val Ser Ala Ser Gln Asp Gly Lys Leu Ile  
65                      70                      75                      80

Ile Trp Asp Ser Tyr Thr Thr Asn Lys Met His Ala Ile Pro Leu Arg  
85                      90                      95

Ser Ser Trp Val Met Thr Cys Ala Tyr Ala Pro Ser Gly Asn Tyr Val  
100                      105                      110

Ala Cys Gly Gly Leu Asp Asn Ile Cys Ser Ile Tyr Asn Leu Lys Thr  
115                      120                      125

Arg Glu Gly Asp Val Arg Val Ser Arg Glu Leu Ala Gly His Thr Gly  
130 135 140

Tyr Leu Ser Cys Cys Arg Phe Leu Asp Asp Gly Gln Ile Ile Thr Ser  
145 150 155 160

Ser Gly Asp Thr Thr Cys Ala Leu Trp Asp Ile Glu Thr Gly Gln Gln  
165 170 175

Thr Thr Thr Phe Thr Gly His Ser Gly Asp Val Met Ser Leu Ser Leu  
180 185 190

Ser Pro Asp Leu Lys Thr Phe Val Ser Gly Ala Cys Asp Ala Ser Ser  
195 200 205

Lys Leu Trp Asp Ile Arg Asp Gly Met Cys Arg Gln Ser Phe Thr Gly  
210 215 220

His Ile Ser Asp Ile Asn Ala Val Ser Phe Phe Pro Ser Gly Tyr Ala  
225 230 235 240



Phe Ala Thr Gly Ser Asp Asp Ala Thr Cys Arg Leu Phe Asp Leu Arg  
245 250 255

Ala Asp Gln Glu Leu Leu Leu Tyr Ser His Asp Asn Ile Ile Cys Gly  
260 265 270

Ile Thr Ser Val Ala Phe Ser Lys Ser Gly Arg Leu Leu Leu Ala Gly  
275 280 285

Tyr Asp Asp Phe Asn Cys Ser Val Trp Asp Ala Leu Lys Gly Gly Arg  
290 295 300

Ser Gly Val Leu Ala Gly His Asp Asn Arg Val Ser Cys Leu Gly Val  
305 310 315 320

Thr Asp Asp Gly Met Ala Val Ala Thr Gly Ser Trp Asp Ser Phe Leu  
325 330 335

Arg Ile Trp Asn  
340

<210> 43  
<211> 307  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<300>  
<308> U37527  
<309> 1997-12-30  
<313> (1)..(307)

<220>  
<221> CDS  
<222> (40)..(267)

<400> 43  
tccaagctgc tgtaccacct ctcagcaggg agtgcagga atg aag gaa ggc atg 54  
Met Lys Glu Gly Met  
1 5  
  
tct aat aac agc acc acc agc atc tcc cag gcc agg aaa gcc gtg gag 102  
Ser Asn Asn Ser Thr Thr Ser Ile Ser Gln Ala Arg Lys Ala Val Glu  
10 15 20  
  
cag ctg aag atg gaa gcc tgc atg gac agg gtg aag gtc tcc cag gct 150  
Gln Leu Lys Met Glu Ala Cys Met Asp Arg Val Lys Val Ser Gln Ala  
25 30 35  
  
gcc tca gac ctc ctg gcc tac tgt gaa gcc cac gtg cgg gag gac ccc 198

Ala Ser Asp Leu Leu Ala Tyr Cys Glu Ala His Val Arg Glu Asp Pro  
40 45 50

ctc atc atc cca gtg cct gcc tca gaa aac ccc ttc cgg gag aag aag 246  
Leu Ile Ile Pro Val Pro Ala Ser Glu Asn Pro Phe Arg Glu Lys Lys  
55 60 65

ttc ttc tgc acc atc ctc taa cacccatggc gatgaagcgg gccctttcct 297  
Phe Phe Cys Thr Ile Leu  
70 75

gctgtaacag 307

<210> 44

<211> 75

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 44

Met Lys Glu Gly Met Ser Asn Asn Ser Thr Thr Ser Ile Ser Gln Ala  
1 5 10 15

Arg Lys Ala Val Glu Gln Leu Lys Met Glu Ala Cys Met Asp Arg Val  
20 25 30

Lys Val Ser Gln Ala Ala Ser Asp Leu Leu Ala Tyr Cys Glu Ala His  
35 40 45

Val Arg Glu Asp Pro Leu Ile Ile Pro Val Pro Ala Ser Glu Asn Pro  
50 55 60

Phe Arg Glu Lys Lys Phe Phe Cys Thr Ile Leu  
65 70 75

<210> 45

<211> 2666

<212> DNA

<213> Mus musculus

<300>

<308> BC023729

<309> 2003-04-16

<313> (1)..(2666)

<220>

<221> CDS

<222> (252)..(2219)

<400> 45

ccacgcgtcc ggccccagcg caacgcgcag cagcctccct cctcttcttc ccgcaactgtg 60  
 cgctcctcct gggctagggc gtctggatcg agtcccggag gctaccgcct ccagacaga 120  
 cgacaggtca cctggacgcg agcctgtgtc cgggtctcgt cgttgccggc gcagtcactg 180  
 ggcacaaccg tgggactccg tctgtctcgg attaatcccg gagagccaga gccaacctct 240  
 cccggtcaga g atg cga ccc tca ggg acc gcg aga acc aca ctg ctg gtg 290  
 Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Arg Thr Thr Leu Leu Val  
 1 5 10  
 ttg ctg acc gcg ctc tgc gcc gca ggt ggg gcg ttg gag gaa aag aaa 338  
 Leu Leu Thr Ala Leu Cys Ala Ala Gly Gly Ala Leu Glu Glu Lys Lys  
 15 20 25  
 gtc tgc caa ggc aca agt aac agg ctc acc caa ctg ggc act ttt gaa 386  
 Val Cys Gln Gly Thr Ser Asn Arg Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu  
 30 35 40 45  
 gac cac ttt ctg agc ctg cag agg atg tac aac aac tgt gaa gtg gtc 434  
 Asp His Phe Leu Ser Leu Gln Arg Met Tyr Asn Asn Cys Glu Val Val  
 50 55 60  
 ctt ggg aac ttg gaa att acc tat gtg caa agg aat tac gac ctt tcc 482  
 Leu Gly Asn Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg Asn Tyr Asp Leu Ser  
 65 70 75  
 ttc tta aag acc atc cag gag gtg gcc ggc tat gtc ctc att gcc ctc 530

Phe Leu Lys Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu  
 80 85 90 .

aac acc gtg gag aga atc cct ttg gag aac ctg cag atc atc agg gga 578  
 Asn Thr Val Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly  
 95 100 105

aat gct ctt tat gaa aac acc tat gcc tta gcc atc ctg tcc aac tat 626  
 Asn Ala Leu Tyr Glu Asn Thr Tyr Ala Leu Ala Ile Leu Ser Asn Tyr  
 110 115 120 125

ggg aca aac aga act ggg ctt agg gaa ctg ccc atg cgg aac tta cag 674  
 Gly Thr Asn Arg Thr Gly Leu Arg Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln  
 130 135 140

gaa atc ctg att ggt gct gtg cga ttc agc aac aac ccc atc ctc tgc 722  
 Glu Ile Leu Ile Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ile Leu Cys  
 145 150 155

aat atg gat act atc cag tgg agg gac atc gtc caa aac gtc ttt atg 770  
 Asn Met Asp Thr Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val Gln Asn Val Phe Met  
 160 165 170

agc aac atg tca atg gac tta cag agc cat ccg agc agt tgc ccc aaa 818  
 Ser Asn Met Ser Met Asp Leu Gln Ser His Pro Ser Ser Cys Pro Lys  
 175 180 185

tgt gat cca agc tgt ccc aat gga agc tgc tgg gga gga gga gag gag 866  
 Cys Asp Pro Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Gly Gly Glu Glu

190	195	200	205	
aac tgc cag aaa ttg acc aaa atc atc tgt gcc cag caa tgt tcc cat				914
Asn Cys Gln Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser His				
	210	215	220	
cgc tgt cgt ggc agg tcc ccc agt gac tgc tgc cac aac caa tgt gct				962
Arg Cys Arg Gly Arg Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala				
	225	230	235	
gcg ggg tgt aca ggg ccc cga gag agt gac tgt ctg gtc tgc caa aag				1010
Ala Gly Cys Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Gln Lys				
	240	245	250	
ttc caa gat gag gcc aca tgc aaa gac acc tgc cca cca ctc atg ctg				1058
Phe Gln Asp Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu				
	255	260	265	
tac aac ccc acc acc tat cag atg gat gtc aac cct gaa ggg aag tac				1106
Tyr Asn Pro Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr				
270	275	280	285	
agc ttt ggt gcc acc tgt gtg aag aag tgc ccc cga aac tac gtg gtg				1154
Ser Phe Gly Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val				
	290	295	300	
aca gat cat ggc tca tgt gtc cga gcc tgt ggg cct gac tac tac gaa				1202

Thr Asp His Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Pro Asp Tyr Tyr Glu  
 305 310 315

gtg gaa gaa gat ggc atc cgc aag tgt aaa aaa tgt gat ggg ccc tgt 1250  
 Val Glu Glu Asp Gly Ile Arg Lys Cys Lys Lys Cys Asp Gly Pro Cys  
 320 325 330

cgc aaa gtt tgt aat ggc ata ggc att ggt gaa ttt aaa gac aca ctc 1298  
 Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Thr Leu  
 335 340 345

tcc ata aat gct aca aac atc aaa cac ttc aaa tac tgc act gcc atc 1346  
 Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Tyr Cys Thr Ala Ile  
 350 355 360 365

agc ggg gac ctt cac atc ctg cca gtg gcc ttt aag ggg gat tct ttc 1394  
 Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Lys Gly Asp Ser Phe  
 370 375 380

acg cgc act cct cct cta gac cca cga gaa cta gaa att cta aaa acc 1442  
 Thr Arg Thr Pro Pro Leu Asp Pro Arg Glu Leu Glu Ile Leu Lys Thr  
 385 390 395

gta aag gaa ata aca ggc ttt ttg ctg att cag gct tgg cct gat aac 1490  
 Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Asp Asn  
 400 405 410

tgg act gac ctc cat gct ttc gag aac cta gaa ata ata cgt ggc aga 1538  
 Trp Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg



415

420

425

aca aag caa cat ggt cag ttt tct ttg gcg gtc gtt ggc ctg aac atc 1586

Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Gly Leu Asn Ile

430

435

440

445

aca tca ctg ggg ctg cgt tcc ctc aag gag atc agt gat ggg gat gtg 1634

Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val

450

455

460

atc att tct gga aac cga aat ttg tgc tac gca aac aca ata aac tgg 1682

Ile Ile Ser Gly Asn Arg Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp

465

470

475

aaa aaa ctc ttc ggg aca ccc aat cag aaa acc aaa atc atg aac aac 1730

Lys Lys Leu Phe Gly Thr Pro Asn Gln Lys Thr Lys Ile Met Asn Asn

480

485

490

aga gct gag aaa gac tgc aag gcc gtg aac cac gtc tgc aat cct tta 1778

Arg Ala Glu Lys Asp Cys Lys Ala Val Asn His Val Cys Asn Pro Leu

495

500

505

tgc tcc tcg gaa ggc tgc tgg ggc cct gag ccc agg gac tgt gtc tcc 1826

Cys Ser Ser Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser

510

515

520

525

tgc cag aat gtg agc aga ggc agg gag tgc gtg gag aaa tgc aac atc 1874

Cys Gln Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Glu Lys Cys Asn Ile

530

535

540

ctg gag ggg gaa cca agg gag ttt gtg gaa aat tct gaa tgc atc cag 1922  
Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln  
545 550 555

tgc cat cca gaa tgt ctg ccc cag gcc atg aac atc acc tgt aca ggc 1970  
Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly  
560 565 570

agg gga cca gac aac tgc atc cag tgt gcc cac tac att gat ggc cca 2018  
Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro  
575 580 585

cac tgt gtc aag acc tgc cca gct ggc atc atg gga gag aac aac act 2066  
His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Ile Met Gly Glu Asn Asn Thr  
590 595 600 605

ctg gtc tgg aag tat gca gat gcc aat aat gtc tgc cac cta tgc cac 2114  
Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Asn Asn Val Cys His Leu Cys His  
610 615 620

gcc aac tgt acc tat gga tgt gct ggg cca ggt ctt caa gga tgt gaa 2162  
Ala Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Ala Gly Pro Gly Leu Gln Gly Cys Glu  
625 630 635

gtg tgg cca tct ggg tac gtt caa tgg cag tgg atc tta aag acc ttt 2210  
Val Trp Pro Ser Gly Tyr Val Gln Trp Gln Trp Ile Leu Lys Thr Phe  
640 645 650

tgg atc taa gaccagaagc catctctgac tcccctctca ccttccagtt 2259  
Trp Ile  
655

tcttccaaat cctctgggcc agccagaggt ctcagattct gccctcttgc cctgtgccca 2319

ccttgttgac cactggacag catatgtgat ggctactgct agtgccagct tcacaagagg 2379

ttaacactac ggactagcca ttcttcctat gtatctgttt ctgcaaatac agccgcttta 2439

cttaagtctc agcacttctt agtctcctct tttcctctca gtagcccaag gggtcattgc 2499

acaaacatgg tgtgaagggc tactttgtca aatgaaaagg tctatcttgg ggggcatttt 2559

tttcttttct ttttttcttg aaacacattg cccagcaaag ccaataaatt tctctcatca 2619

ttttgtttct gataaattct tactattgat aaaaaaaaaa aaaaaaa 2666

<210> 46

<211> 655

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 46

Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Arg Thr Thr Leu Leu Val Leu Leu Thr

1

5

10

15

Ala Leu Cys Ala Ala Gly Gly Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln  
20 25 30

Gly Thr Ser Asn Arg Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe  
35 40 45

Leu Ser Leu Gln Arg Met Tyr Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn  
50 55 60

Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys  
65 70 75 80

Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val  
85 90 95

Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly Asn Ala Leu  
100 105 110

Tyr Glu Asn Thr Tyr Ala Leu Ala Ile Leu Ser Asn Tyr Gly Thr Asn  
115 120 125

Arg Thr Gly Leu Arg Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu  
130 135 140

Ile Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ile Leu Cys Asn Met Asp  
145 150 155 160

Thr Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val Gln Asn Val Phe Met Ser Asn Met  
165 170 175

Ser Met Asp Leu Gln Ser His Pro Ser Ser Cys Pro Lys Cys Asp Pro  
180 185 190

Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Gly Gly Glu Glu Asn Cys Gln  
195 200 205

Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser His Arg Cys Arg  
210 215 220

Gly Arg Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys  
225 230 235 240

Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Gln Lys Phe Gln Asp  
245 250 255

Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro  
260 265 270

Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly  
275 280 285

Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His  
290 295 300

Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Pro Asp Tyr Tyr Glu Val Glu Glu  
305 310 315 320

Asp Gly Ile Arg Lys Cys Lys Lys Cys Asp Gly Pro Cys Arg Lys Val  
325 330 335

Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Thr Leu Ser Ile Asn  
340 345 350

Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Tyr Cys Thr Ala Ile Ser Gly Asp  
355 360 365

Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Lys Gly Asp Ser Phe Thr Arg Thr  
370 375 380

Pro Pro Leu Asp Pro Arg Glu Leu Glu Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu  
385 390 395 400

Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Asp Asn Trp Thr Asp  
405 410 415

Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln  
420 425 430

His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Gly Leu Asn Ile Thr Ser Leu  
435 440 445

Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser  
450 455 460

Gly Asn Arg Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu

465                      470                      475                      480

Phe Gly Thr Pro Asn Gln Lys Thr Lys Ile Met Asn Asn Arg Ala Glu  
                            485                      490                      495

Lys Asp Cys Lys Ala Val Asn His Val Cys Asn Pro Leu Cys Ser Ser  
                            500                      505                      510

Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Gln Asn  
                            515                      520                      525

Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Glu Lys Cys Asn Ile Leu Glu Gly  
                            530                      535                      540

Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro  
545                      550                      555                      560

Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro  
                            565                      570                      575

Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val



580

585

590

Lys Thr Cys Pro Ala Gly Ile Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp

595

600

605

Lys Tyr Ala Asp Ala Asn Asn Val Cys His Leu Cys His Ala Asn Cys

610

615

620

Thr Tyr Gly Cys Ala Gly Pro Gly Leu Gln Gly Cys Glu Val Trp Pro

625

630

635

640

Ser Gly Tyr Val Gln Trp Gln Trp Ile Leu Lys Thr Phe Trp Ile

645

650

655

**【図面の簡単な説明】****【図 1】**

図 1 は、H E K 2 9 3 細胞を用いた場合の種々のアクチン作用物質およびコントロールとしてのゼラチンを用いた結果の一例を示す。

**【図 2】**

図 2 は、フィブロネクチンのフラグメントを用いた場合のトランスフェクション効率の結果の一例を示す。

**【図 3】**

図 3 は、フィブロネクチンのフラグメントを用いた場合のトランスフェクション効率の結果の一例を示す。

**【図 4】**

図4は、図2および図3からまとめたフィブロネクチンのフラグメントを用いた場合のトランスフェクション効率の結果の一例を示す。

【図5】

図5は、種々の細胞におけるトランスフェクション効率を調べた結果の一例を示す。

【図6】

図6は、種々のプレートを用いた場合のトランスフェクションの状態を示す結果の一例を示す。

【図7】

図7は、フィブロネクチンの濃度を0、0.27、0.53、0.8、1.07および1.33（それぞれ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ）として種々のプレート上でトランスフェクションを行った場合の結果を示す。

【図8】

図8は、フィブロネクチンの有無での、細胞接着プロファイルを示す写真の一例を示す。

【図9】

図9は、フィブロネクチンの有無での、細胞接着プロファイルを示す切片写真の一例を示す。

【図10】

図10は、核の表面積の推移を示す。

【図11】

図11は、トランスフェクションアレイチップとして構築した場合のトランスフェクション実験の結果の一例を示す。

【図12】

図12は、アレイ上での各スポット間の夾雑の様子を示す一例である。

【図13】

図13は、実施例4における本発明の固相トランスフェクションによって、空間的に分離したDNAの細胞内への取り込みを示す図である。

図13Aは、固相系トランスフェクションアレイ（SPTA）作製方法を模式

的に示した図である。この図は、固相トランスフェクションの方法論を示す。

図13Bは、固相トランスフェクションの結果を示す。HEK293細胞株を用いてSPTAを作製した結果を示す。緑色の部分は、トランスフェクションされた付着細胞を示す。この結果から、本発明の方法によって、空間的に分離された、異なる遺伝子によってトランスフェクトされた細胞の集団を調製することが可能となった。

#### 【図13C】

図13Cは、固相トランスフェクションの一例を示す。

#### 【図14】

図14Aおよび図14Bは、液相トランスフェクションとSPTAの比較を示す結果である。

図14Aは、実験に用いた5つの細胞株について、GFP強度/mm<sup>2</sup>を測定した結果を示す。図14Aは、トランスフェクション効率を、単位面積あたりの総蛍光強度として決定する方法を示す。

図14Bは、図14Aの示すデータに対応する、EGFPを発現する細胞の蛍光画像である。図14Bにおいて、白丸で示された領域は、プラスミドDNAを固定化した領域を示す。プラスミドDNAを固定化した領域以外の領域では、細胞が固相に固定化されたにもかかわらず、EGFPを発現する細胞は観察されなかった。白棒は、500μmを示す。

#### 【図14C】

図14Cは、本発明のトランスフェクション法の一例を示す。

#### 【図14D】

図14Dは、本発明のトランスフェクション法の一例を示す。

#### 【図15】

図15は、チップのコーティングによって相互夾雑が低減された結果を示す。

図15は、HEK293細胞、HeLa細胞、NIT3T3細胞（「3T3」として示す）、HepG2細胞、およびhMSCを用いて、液相トランスフェクション法およびSPTAを行った結果を示す。トランスフェクション効率を、GFP強度で示す。

**【図 16】**

図 16 は、各スポット間の相互夾雑に関する様子を示す図である。A P S または P L L (ポリ-L-リジン) でコーティングしたチップに対して、所定の濃度のフィブロネクチンを含む核酸混合物を固定化し、その固定化したチップを用いて細胞トランスフェクションした結果、相互夾雑は観察されなかった(上段および中断)。これに対して、チップをコーティングしなかった場合、固定化核酸の有意な相互夾雑が観察された(下段)。

**【図 16 C】**

図 16 C は、核酸の固定化において使用する混合物中に使用される物質の種類と、細胞接着速度との相関関係を示す。このグラフは、時間経過に伴う、接着細胞の割合の増加を示す。グラフの傾きが緩やかな場合は、グラフの傾き急な場合と比較して、より多くの時間が細胞接着に必要なことを示す。

**【図 16 D】**

図 16 D は、図 16 C 中のグラフを拡大して示したものである。

**【図 17】**

図 17 は、本発明の方法をコンピュータにおいて実行したときの一構成例を示す。

**【図 18 A】**

図 18 A は、本発明の数理的解析法の一例を示す。

**【図 18 B】**

図 18 B は、本発明の数理的解析法の別の一例を示す。

**【図 19】**

図 19 は、本発明で用いたプロモーター含有プラスミド例および本発明の解析の一例を示す。

**【図 20】**

図 20 は、分化誘導初期における数理的解析結果の一例を示す。

**【図 21】**

図 21 は、未分化維持における数理的解析結果の一例を示す。

**【図 22】**

図 22 は、カクテルパーティープロセスの模式図を示す。

【図 23】

図 23 は、遺伝子転写スイッチレポーター（本発明において使用されるトランスフェクションプラスミド）の構築例を示す。

【図 24】

図 24 は、転写因子レポーターセットの構築例を示す。

【図 25】

図 25 は、転写因子レポーターのアッセイ例を示す。

【図 26】

図 26 は、骨分化過程における転写因子活性の時系列測定例を示す。

【図 27】

図 27 は、転写因子活性の振動現象および位相解析の例を示す。

【図 28】

図 28 は、siRNA 実験のプロトコルを示す。

【図 29】

図 29 は、siRNA 実験の結果を示す。上は hMSC での結果を示し、下は HeLa 細胞での結果を示す。数字は、siRNA の濃度 ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) を示す。抗 GFP siRNA での結果を左に示し、右にはスクランブル siRNA での結果を示す。

【図 30】

図 30 は、テトラサイクリン依存性プロモーターを使用したときの変化の様子を示す。

【図 31】

図 31 は、テトラサイクリン依存性プロモーターおよびテトラサイクリン非依存性プロモーターを用いたときの、発現の様子を示す図である。

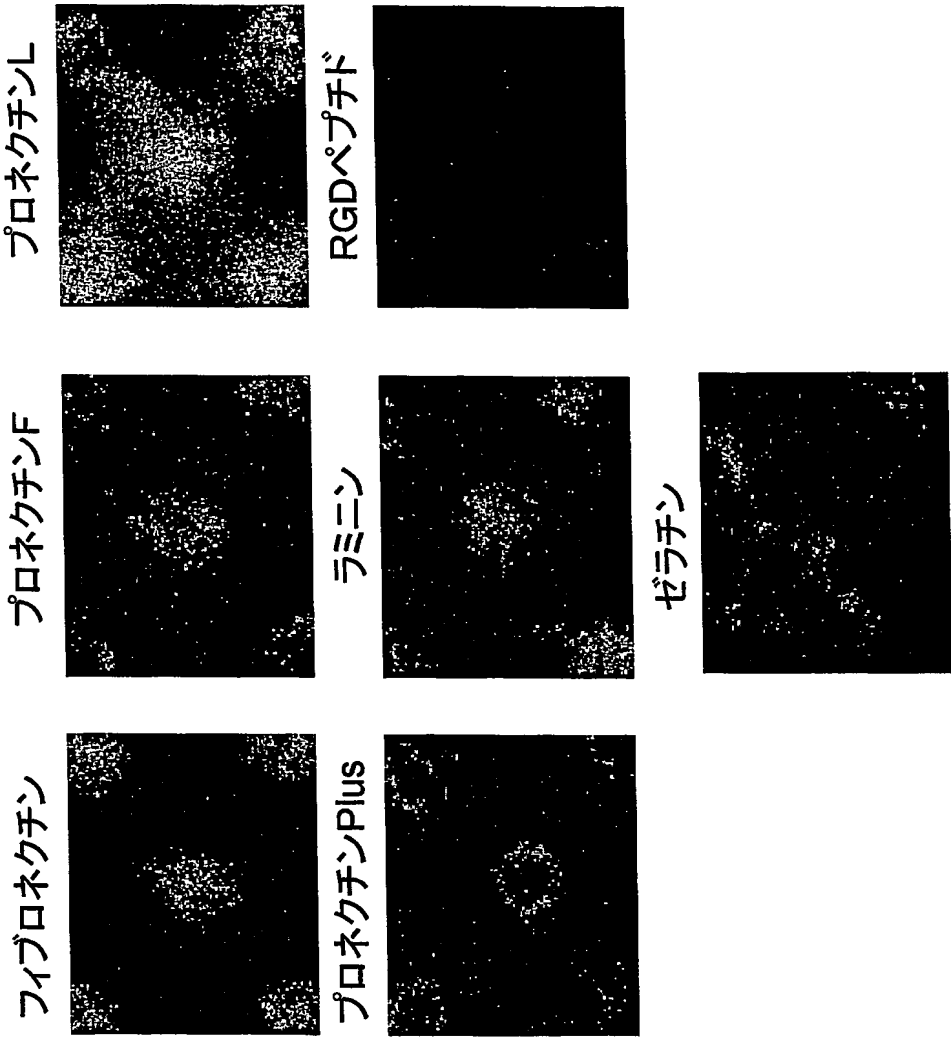
【図 32】

システム構成例である。

【書類名】 図面

【図 1】

トランスフェクション効率に対する、付着した分子の効果 (HEK細胞)  
HEK293細胞に対してEffectene試薬を用いてpEGFP-N1をトランスフェクションした

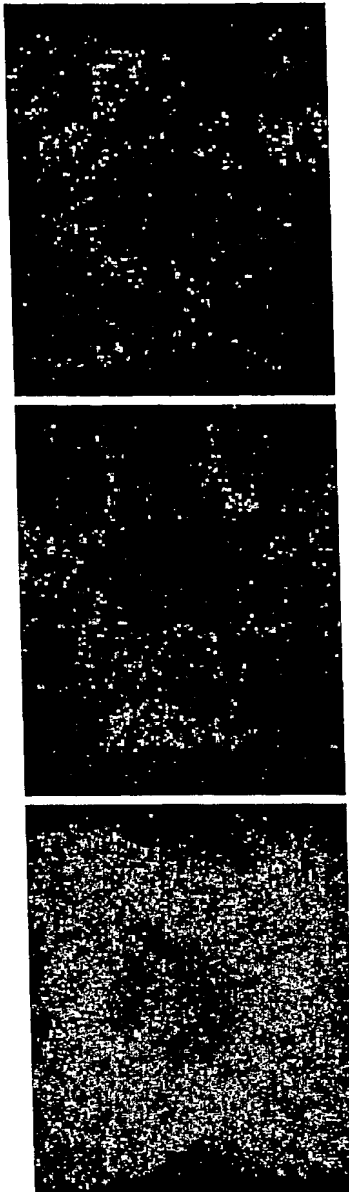


【図 2】

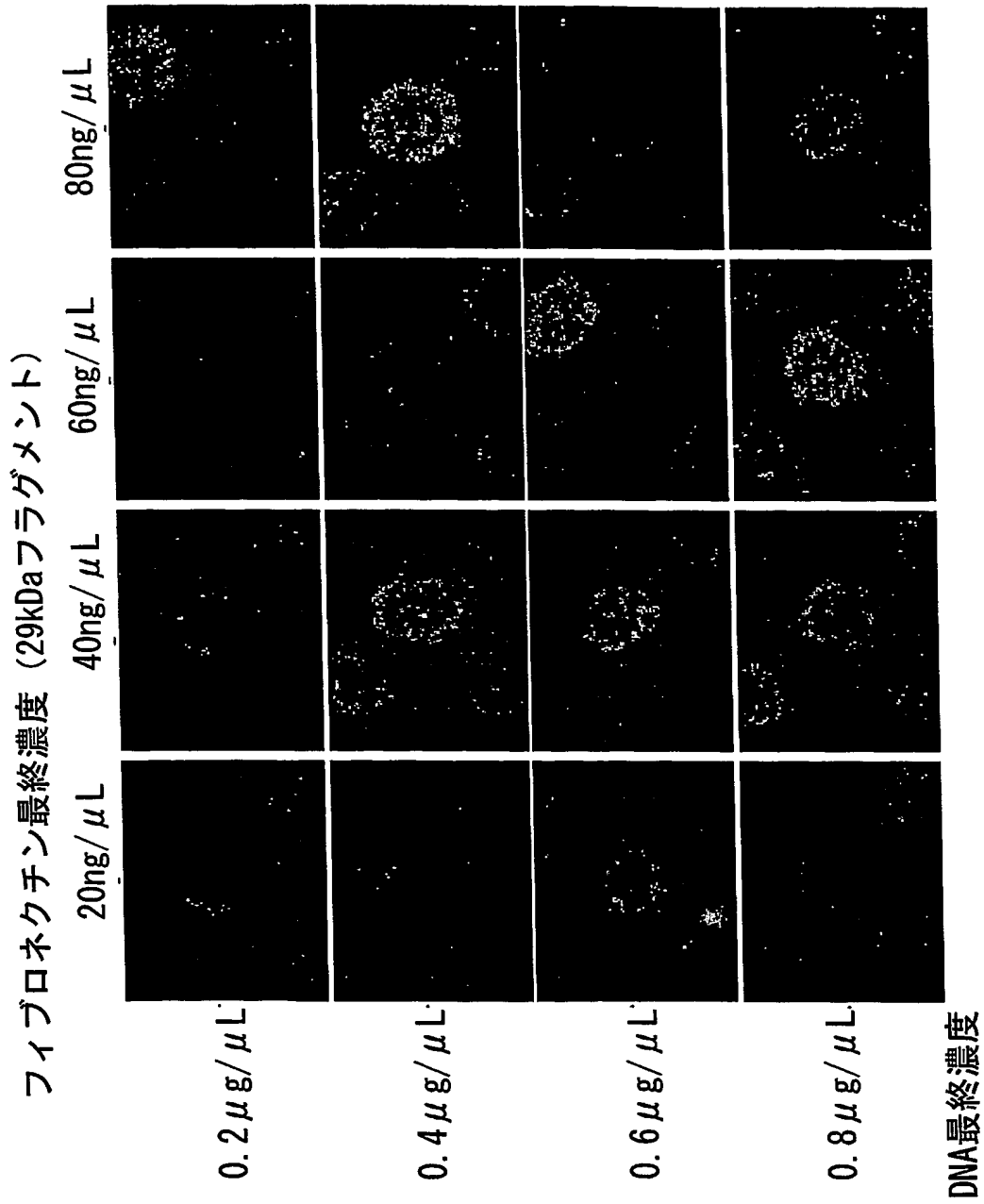
フィブロネクチン (43kDaフラグメント)



フィブロネクチン (72kDaフラグメント)

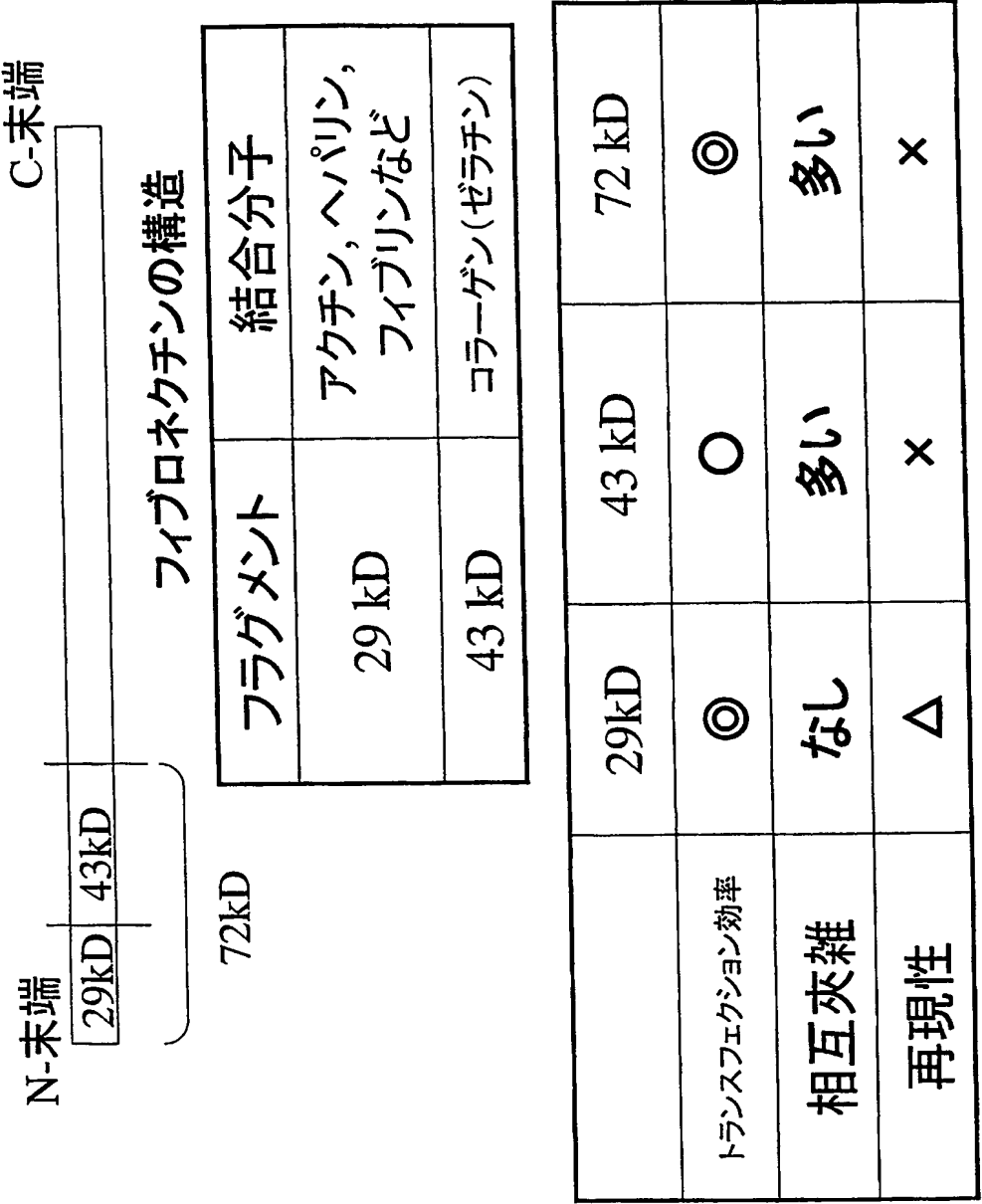


【図 3】

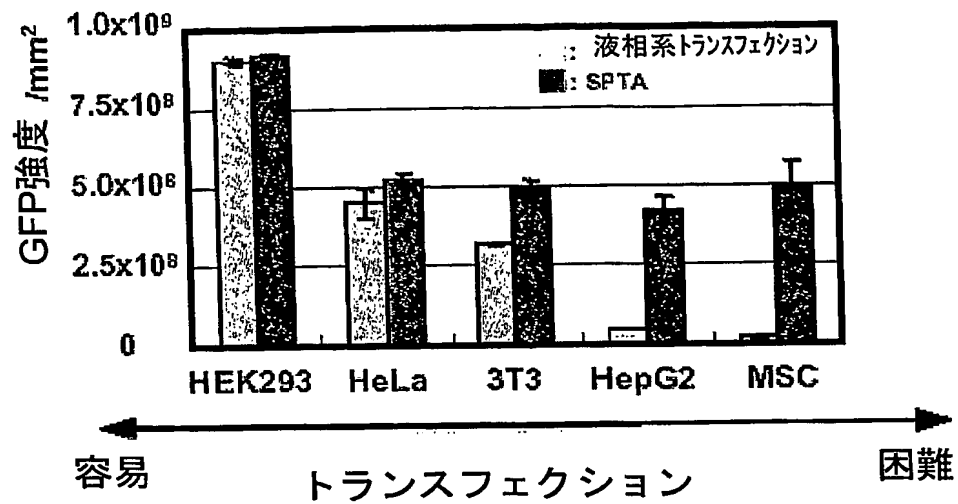




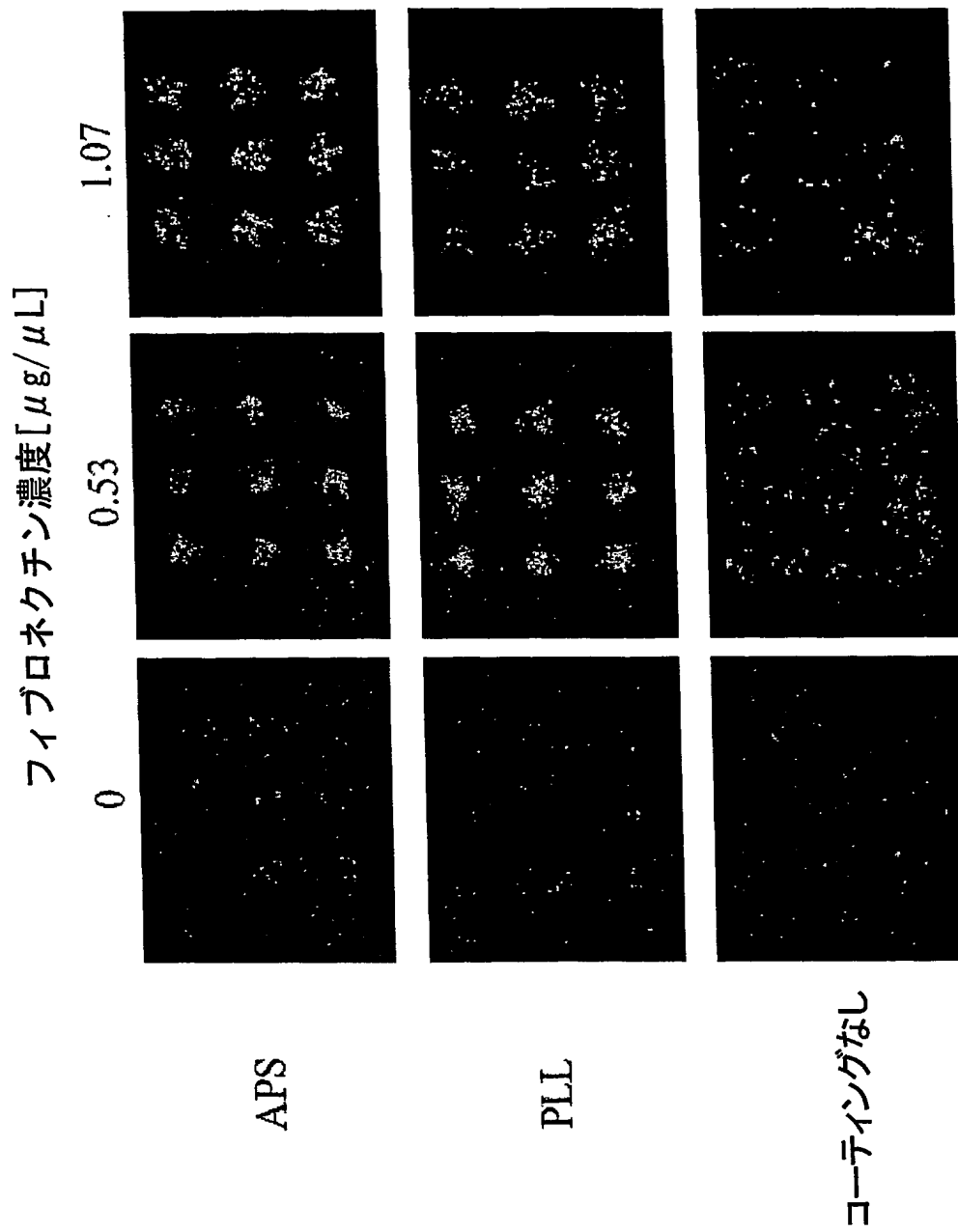
【図4】



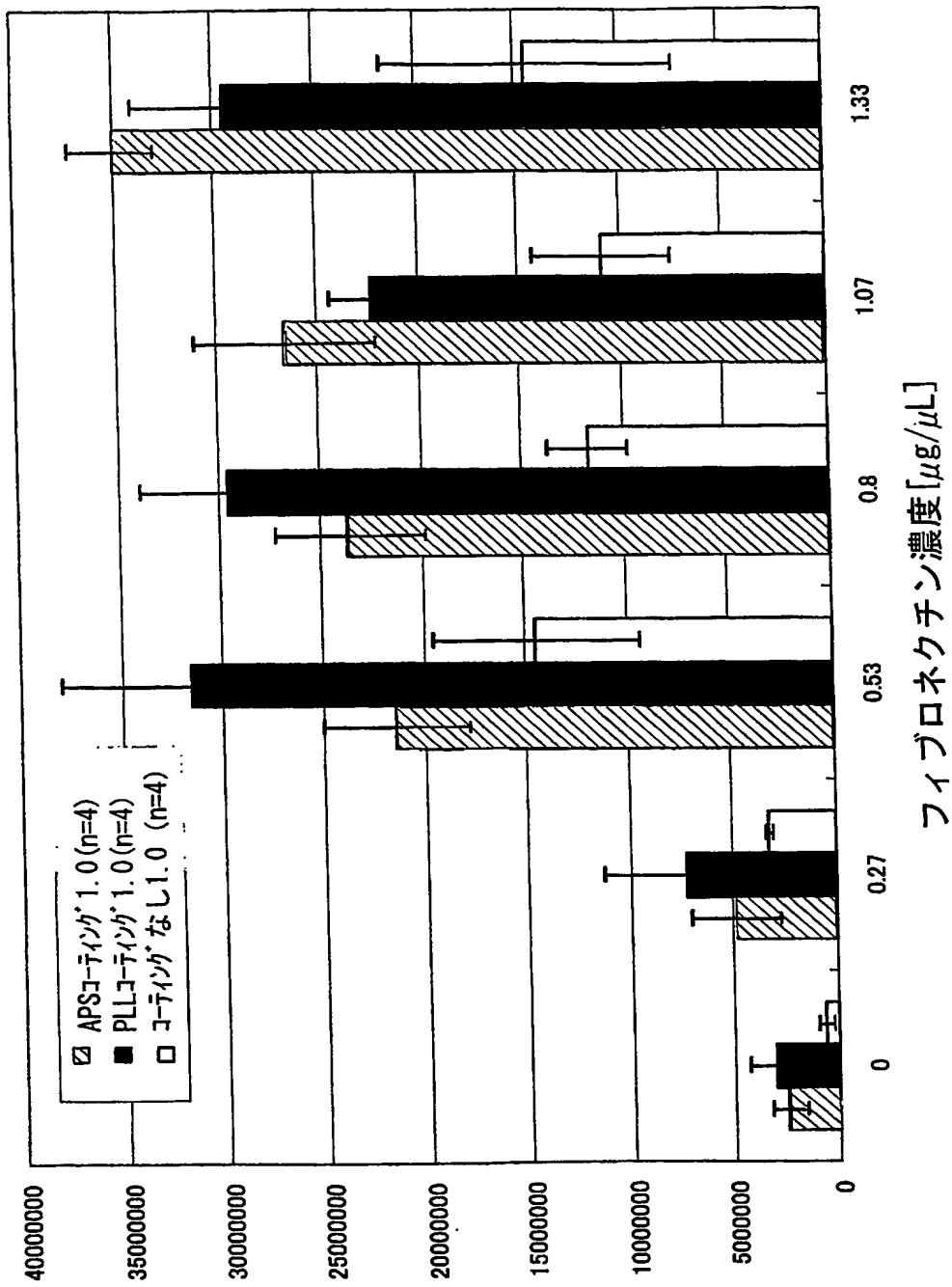
【図 5】



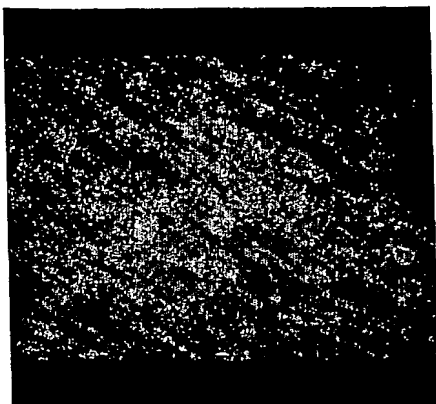
【図 6】



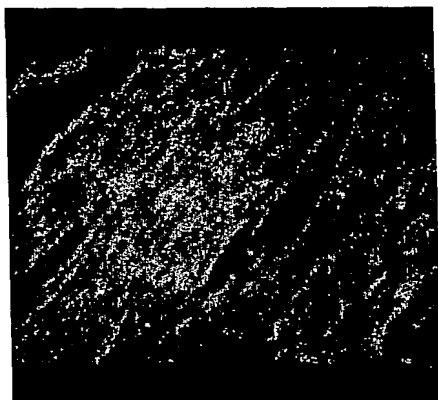
【図7】



【図 8】

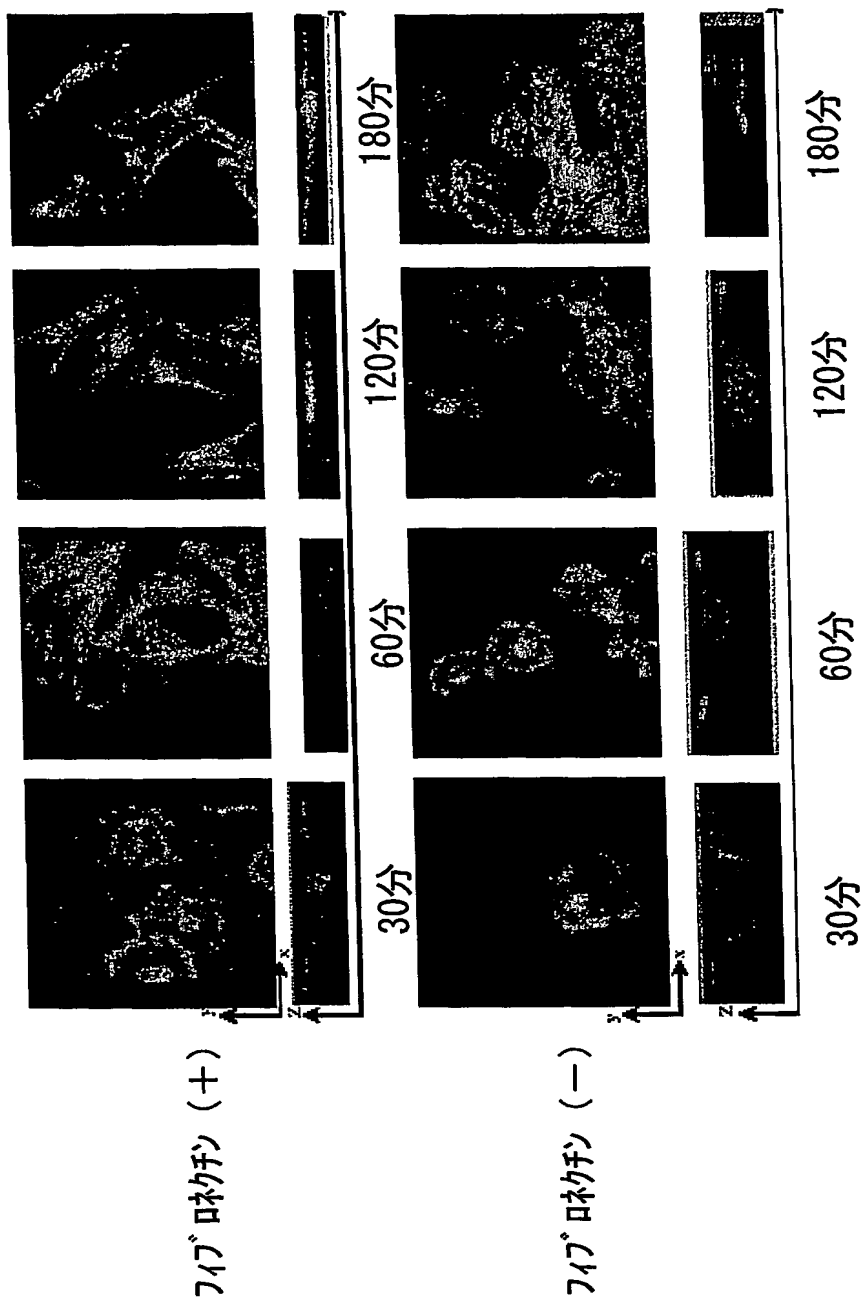


フィブロンネクチン (ー)



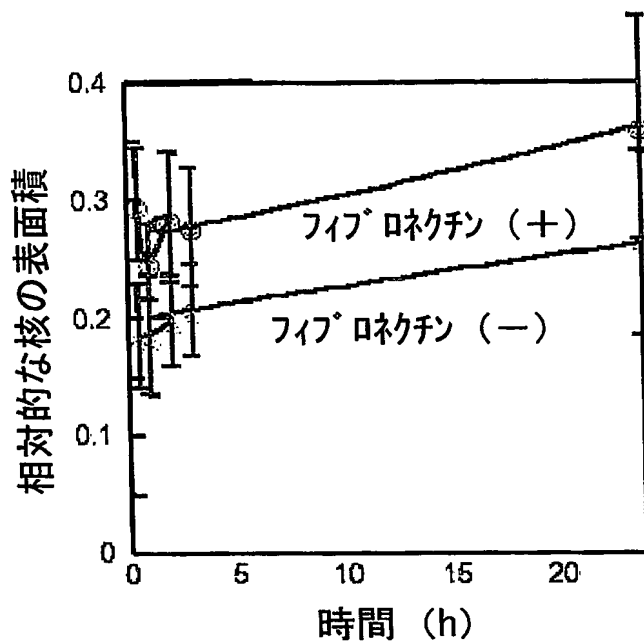
フィブロンネクチン (+)

【図9】



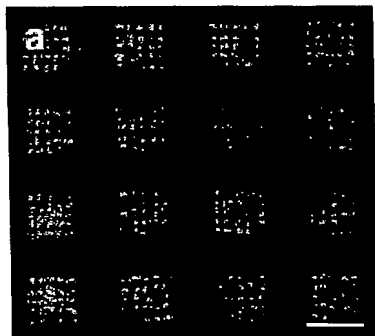
共焦点レーザー走査顕微鏡によるヒト間葉系幹細胞(hMSC)の切片観察。hMSCを、4%のPFAを用い、数回インキュベートして、固定化した。青色蛍光(核:SYTO61)および赤色蛍光(核:テキサスレッド-Xフロロジンを、共焦点レーザー走査顕微鏡(LSM510, Carl Zeiss Co., Ltd、ピンホールサイズ=1.0;画像間隔=0.4)を用いて、得た。

【図 10】



共焦点レーザー走査顕微鏡画像の切片観察によって決定された相対的な核の表面積。ヒト間葉系幹細胞を、4%のPFAを用い、数回インキュベートして、固定化した。

【図 11】



【図12】



【図13】

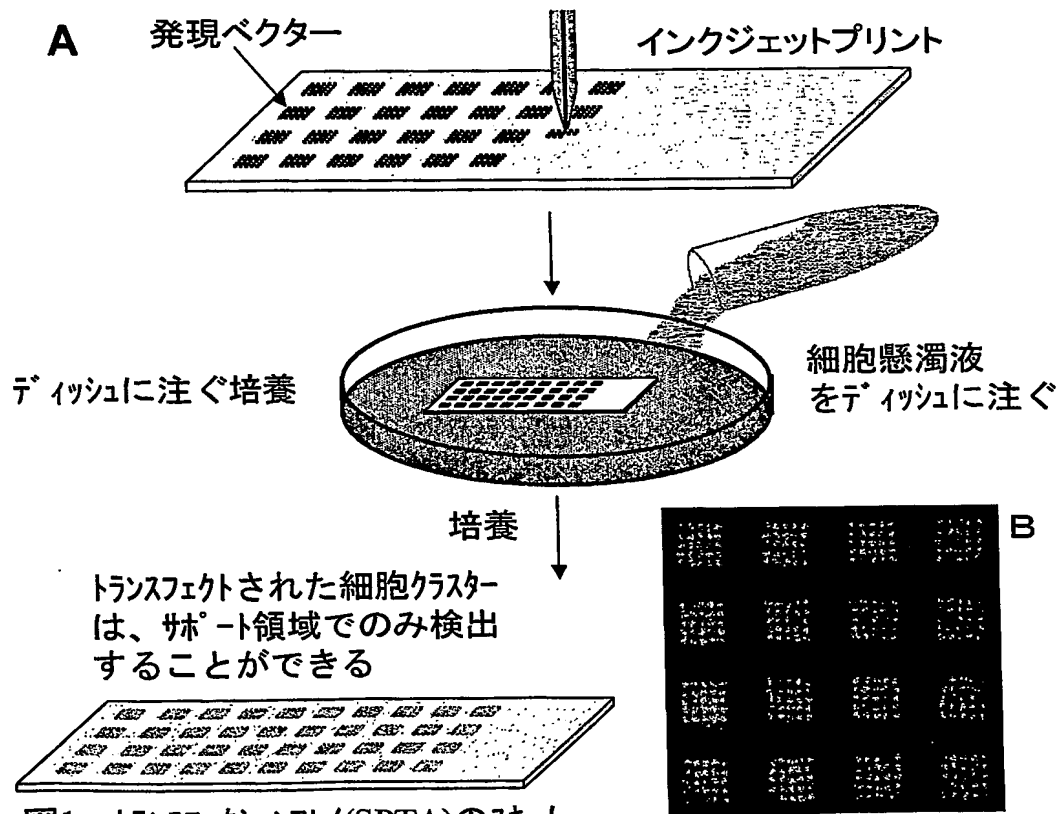
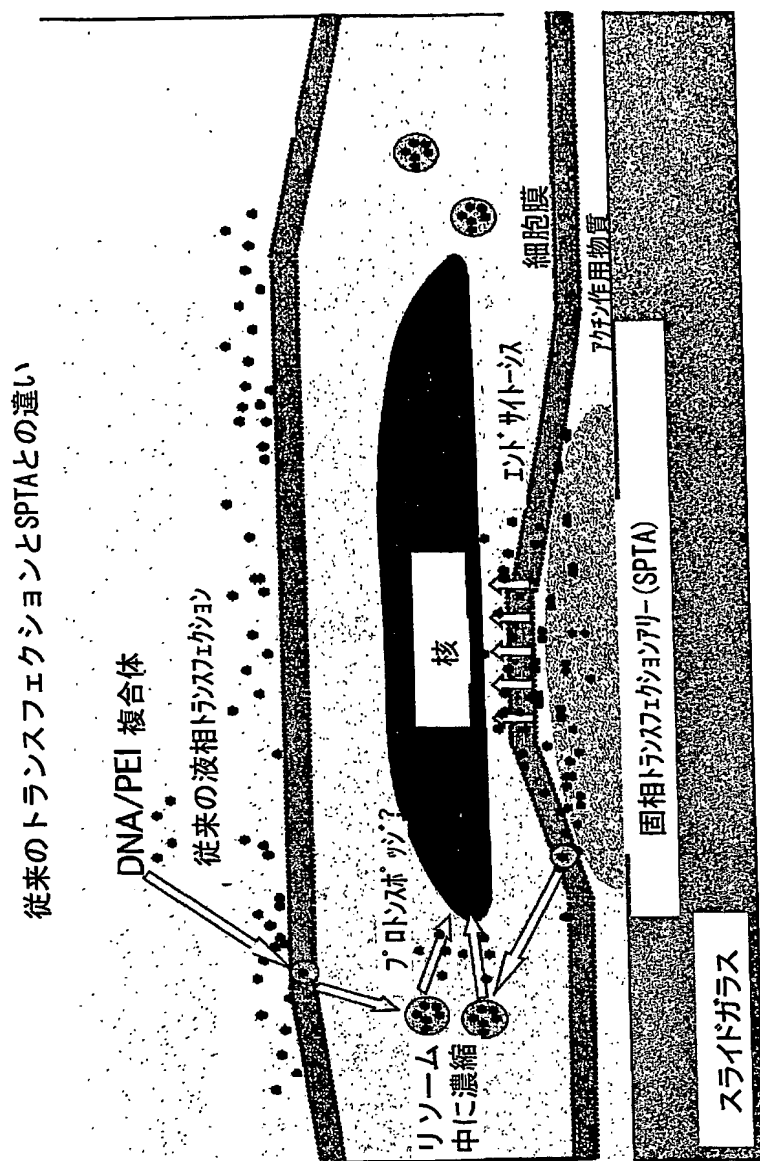


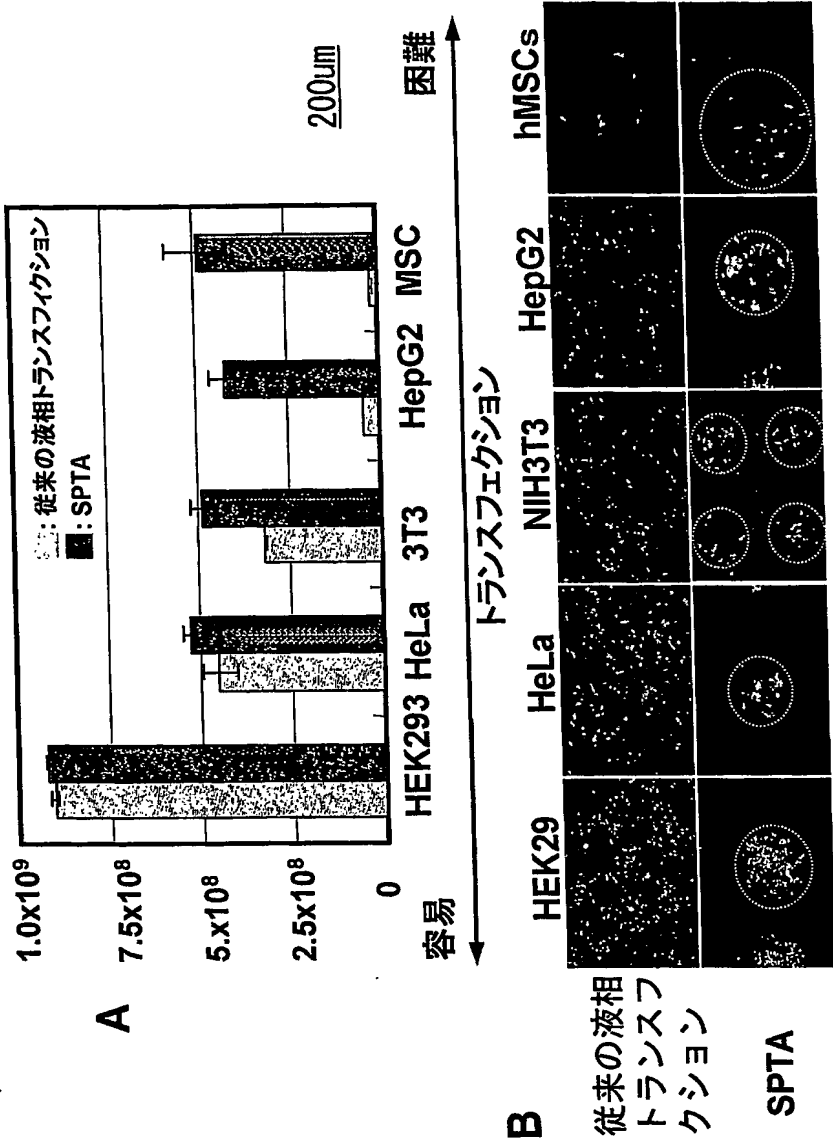
図1. トランスフェクションアレイ(SPTA)のスキーム  
(A)SPTA判定のアウトライン  
(B)HEK293細胞株でのSPTAの結果バーは3mm



【図13C】



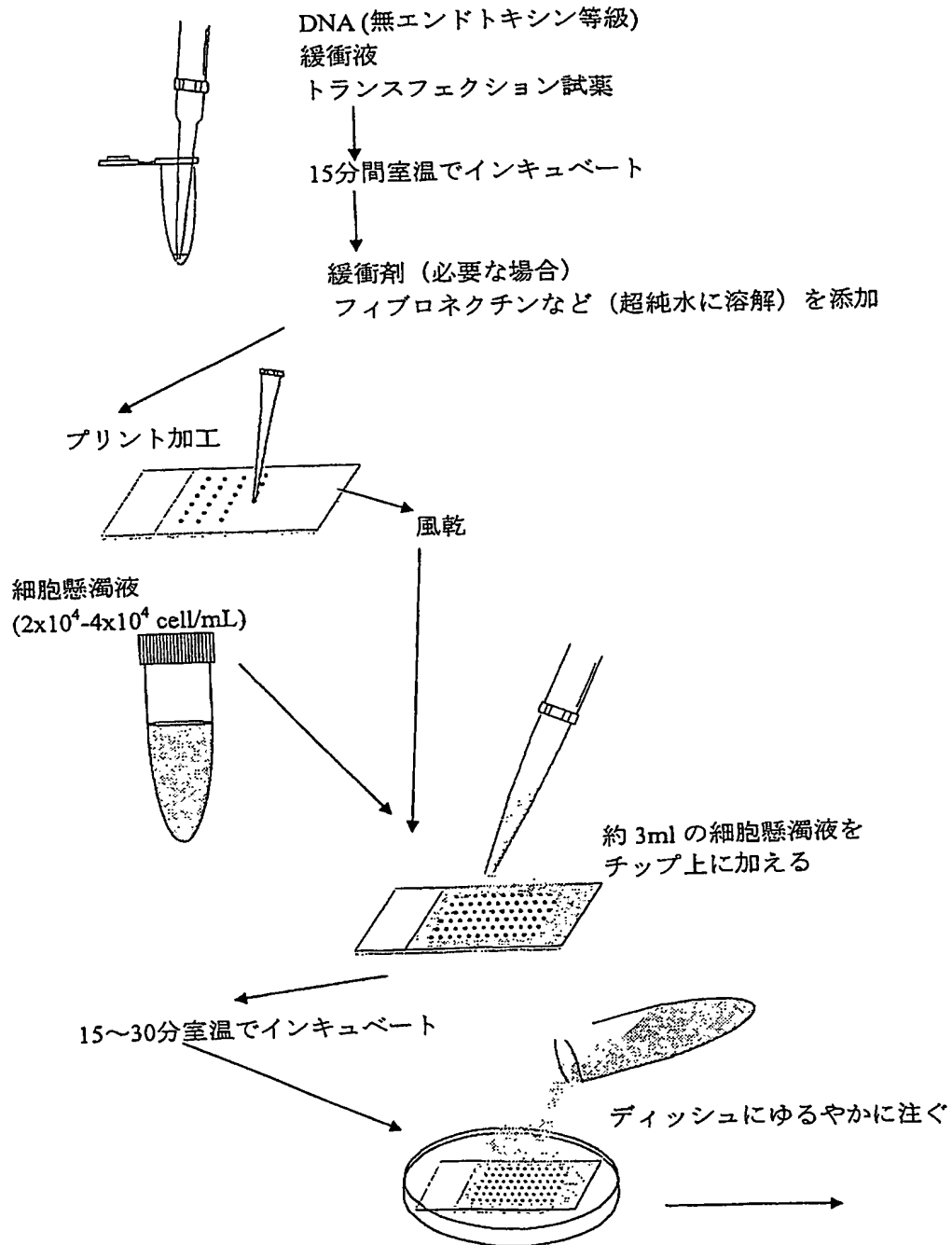
【図14】



従来の液相トランスフェクションとSPTAとの間の比較。A)測定された蛍光/mm²5種の細胞株についてのA)に対応する。B)EGFP発現細胞の蛍光写真。白色の円状のものは、プラスミドDNAプリント領域にあたる。この領域の外の領域の細胞はEGFPを発現しているが、プリント領域以外の領域にも細胞は付着

【図 14 C】

## 固相トランスフェクション法



【図 14 D】

## HEK293

DMEM (無血清)	9.5	μL
プラスミド DNA (1mg/mL)	1.5	μL
TransFast (1mg/mL)	9.0	μL
DMEM (serum free)	5.0	μL
フィブロネクチン(4mg/mL)	5.0	μL
最終容量	30.0	μL

## HeLa, NIH3T3-3, HepG2

DMEM (無血清)	14.5	μL
プラスミド DNA (1mg/mL)	1.5	μL
Lipofectamine2000	4.5	μL
DMEM (serum free)	5.0	μL
フィブロネクチン(4mg/mL)	5.0	μL
最終容量	30.0	μL

## hMSCs

	N/P=5	N/P=10	N/P=20	
DMEM (無血清)	12.75	12.0	10.5	μL
プラスミド DNA (1mg/mL)	1.5	1.5	1.5	μL
JetPEI (x4) conc.	0.75	1.5	3.0	μL
フィブロネクチン(4mg/mL)	5.0	5.0	5.0	μL
最終容量	20.0	20.0	20.0	μL

## HEK293 用スチーム

## 1.5mL マイクロチューブ

↓←DMEM  
 ↓←プラスミド DNA  
 混合 2~3 日, 37℃, 5%CO<sub>2</sub> で  
 インキュベート  
 ↓←TransFast  
 完全に混合し 15 分室温で  
 インキュベート  
 ↓←DMEM  
 ↓←フィブロネクチン  
 完全に混合  
 ↓  
 プリント準備完了

## HeLa, NIH3T3-3, および HepG2 用スチーム

## 1.5mL マイクロチューブ

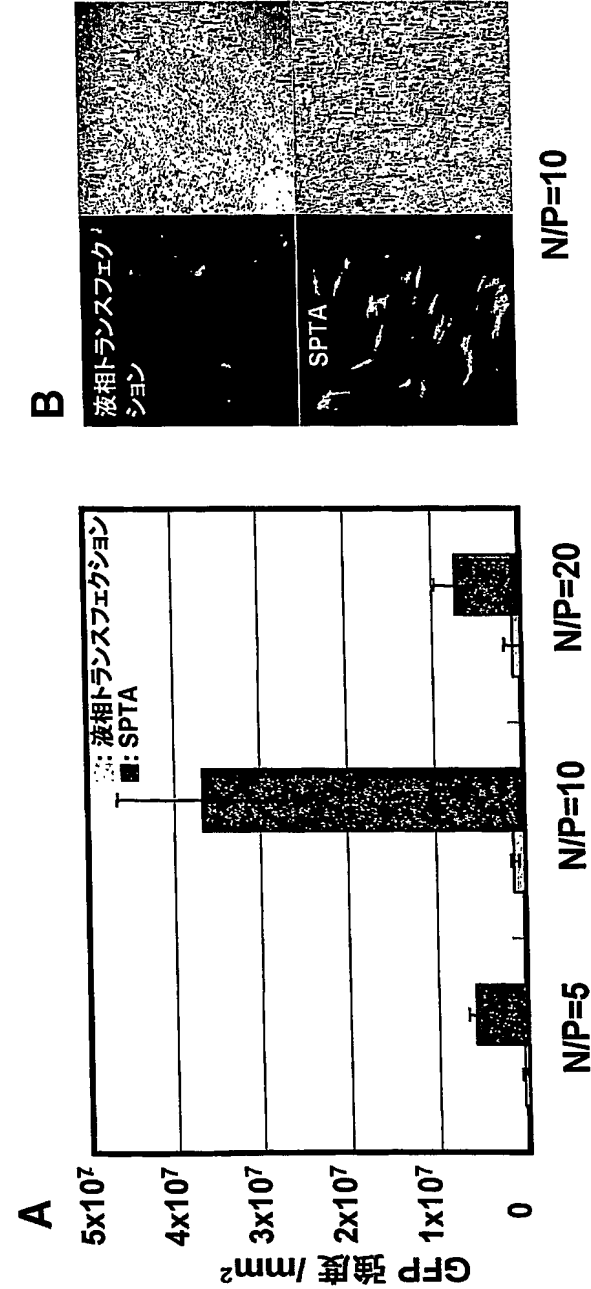
↓←DMEM  
 ↓←プラスミド DNA  
 混合  
 ↓←Lipofectamine2000  
 完全に混合し 15 分室温で  
 インキュベート  
 ↓←DMEM  
 ↓←フィブロネクチン  
 完全に混合  
 ↓  
 プリント準備完了

## hMSCs 用スチーム

## 1.5mL マイクロチューブ

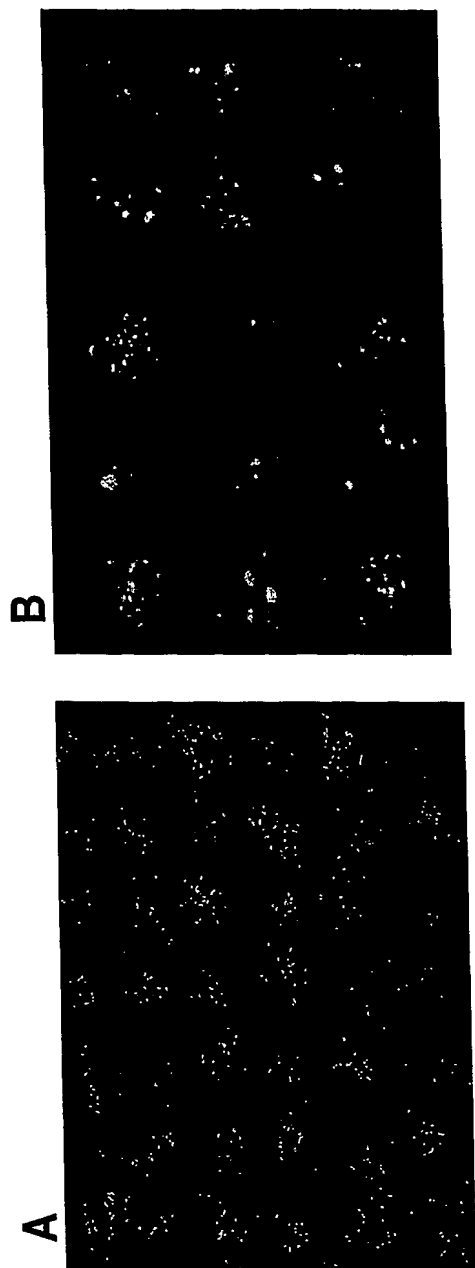
↓←DMEM  
 ↓←プラスミド DNA  
 混合  
 ↓←jetPEI  
 完全に混合し 15 分室温で  
 インキュベート  
 ↓←フィブロネクチン  
 完全に混合  
 ↓  
 プリント準備完了

【図 15】



使用するN/P比によるhMSCのトランスフェクション効率。  
従来の液相トランスフェクションの場合には (B上) hMSC細胞は死に、SPTAの場合は細胞形態は正常である。

【図16】



相互夾雑についての研究: pEGFP-N1およびpDsRed2-N1を、市松模様にプリントし、そしてhMSC (パネルA) またはHEK293 (パネルB) を培養した。

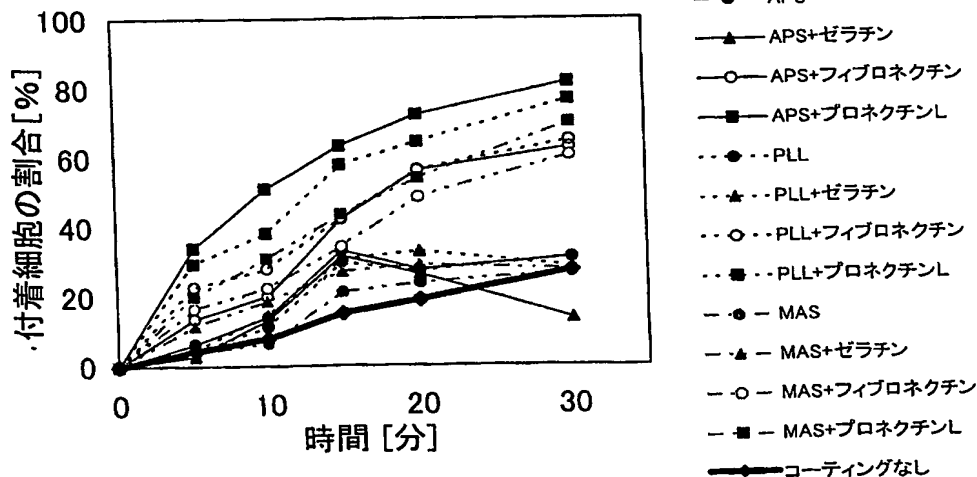
【図16C】

細胞接着数

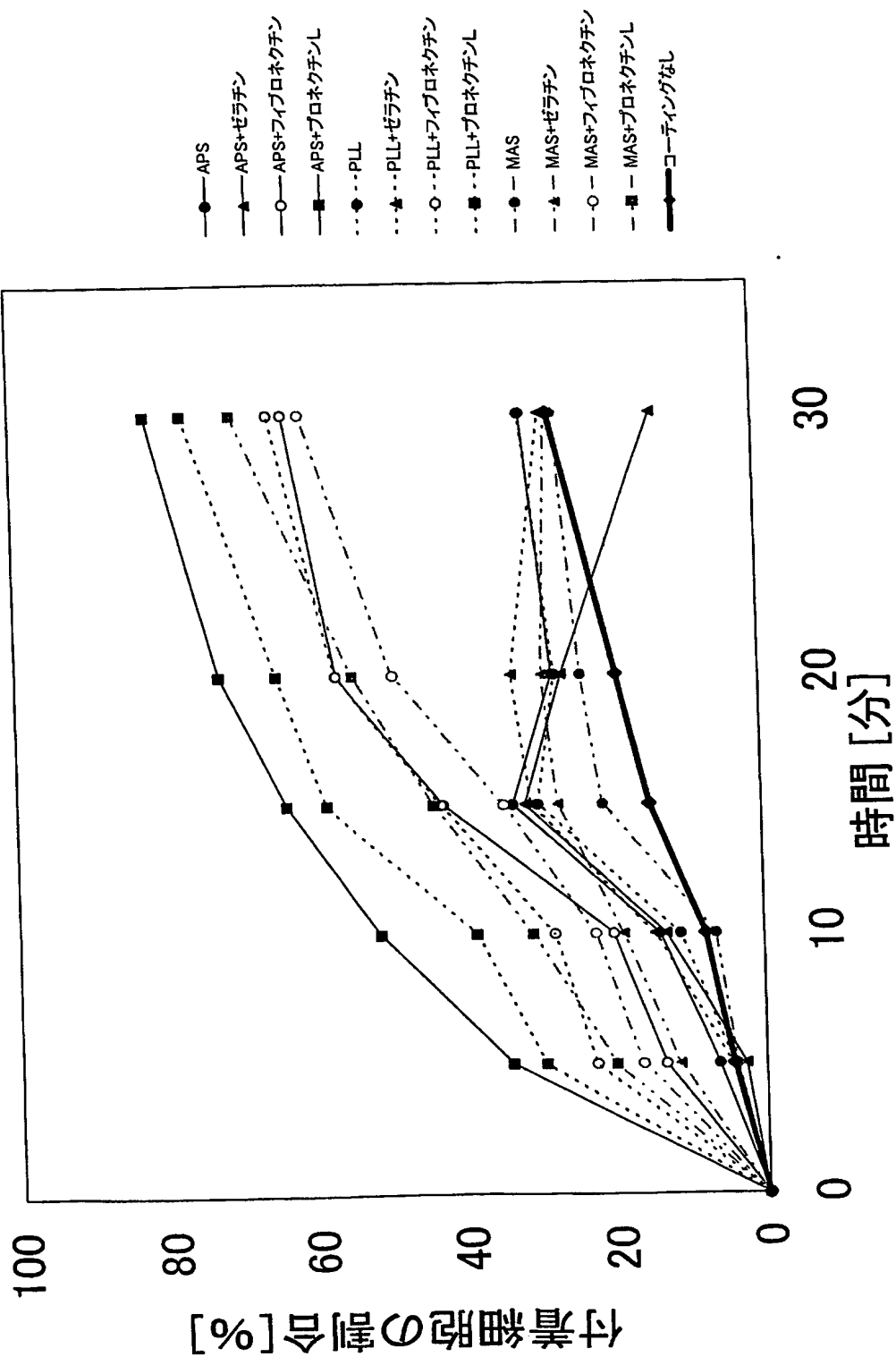
	時間(分)	0	5	10	15	20	30
APS	235	220	202	157	170	162	
APS+ゼラチン	212	206	184	145	156	183	
APS+フィブロネクチン	229	198	183	132	100	85	
APS+プロネクチンL	257	170	126	94	71	47	
PLL	231	221	205	162	168	159	
PLL+ゼラチン	218	208	186	151	146	156	
PLL+フィブロネクチン	225	174	162	129	98	79	
PLL+プロネクチンL	214	151	132	90	76	50	
MAS	231	222	216	182	176	169	
MAS+ゼラチン	224	198	182	163	159	162	
MAS+フィブロネクチン	218	182	169	143	112	86	
MAS+プロネクチンL	220	176	152	124	101	66	
コーティングなし	226	216	208	192	183	164	

細胞接着率(付着細胞の割合(%))

	時間(分)	0	5	10	15	20	30
APS	0	6.382979	14.04255	33.19149	27.65957	31.06383	
APS+ゼラチン	0	2.830189	13.20755	31.60377	26.41509	13.67925	
APS+フィブロネクチン	0	13.53712	20.08734	42.35808	56.33188	62.8821	
APS+プロネクチンL	0	33.85214	50.97276	63.42412	72.37354	81.71206	
PLL	0	4.329004	11.25541	29.87013	27.27273	31.16883	
PLL+ゼラチン	0	4.587156	14.6789	30.73394	33.02752	28.44037	
PLL+フィブロネクチン	0	22.66667	28	42.66667	56.44444	64.88889	
PLL+プロネクチンL	0	29.43925	38.31776	57.94393	64.48598	76.63551	
MAS	0	3.896104	6.493506	21.21212	23.80952	26.83983	
MAS+ゼラチン	0	11.60714	18.75	27.23214	29.01786	27.67857	
MAS+フィブロネクチン	0	16.51376	22.47706	34.40367	48.62385	60.55046	
MAS+プロネクチンL	0	20	30.90909	43.63636	54.09091	70	
コーティングなし	0	4.424779	7.964602	15.04425	19.02655	27.43363	

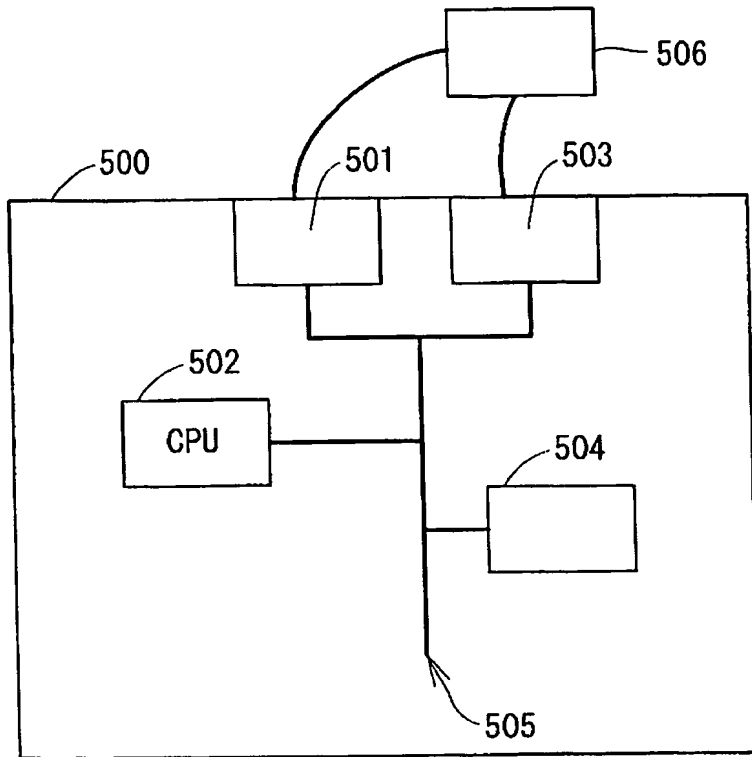


【図16D】



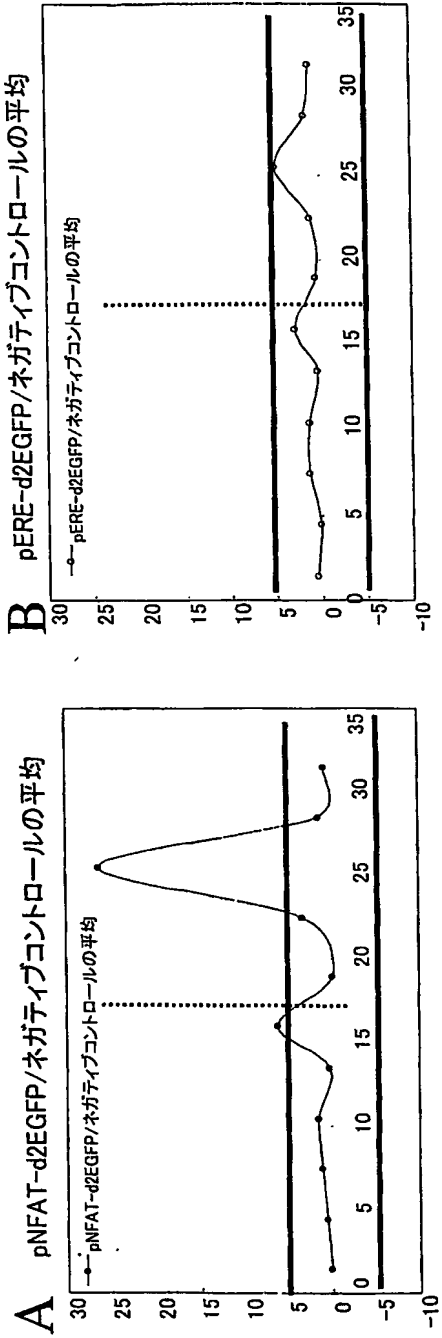


【図 17】



【図 18A】

数理的解析法



A及びBのようなプロモーターのプロファイルを蛍光強度の経時変化を測定することにより取得する。尚、このプロファイルは、細胞や培地の自家蛍光を用いて正規化してある。この後に、レポーター発現変動の振幅を比較するために、振幅幅=5以上( $TH \geq 5$ )の発現変動を状態が変化したと判断した。また、分化誘導開始初期(0-17.5時間)と後期(17.5-31.5時間)及び、トータル(0-31.5時間)の区間に区切って、振幅幅=5以上( $TH \geq 5$ )の発現変動観察したものを(+)、それ以下の変動であったものを(-)と定義した。この定義から、A及びBのプロファイルは、以下の表のように評価された。

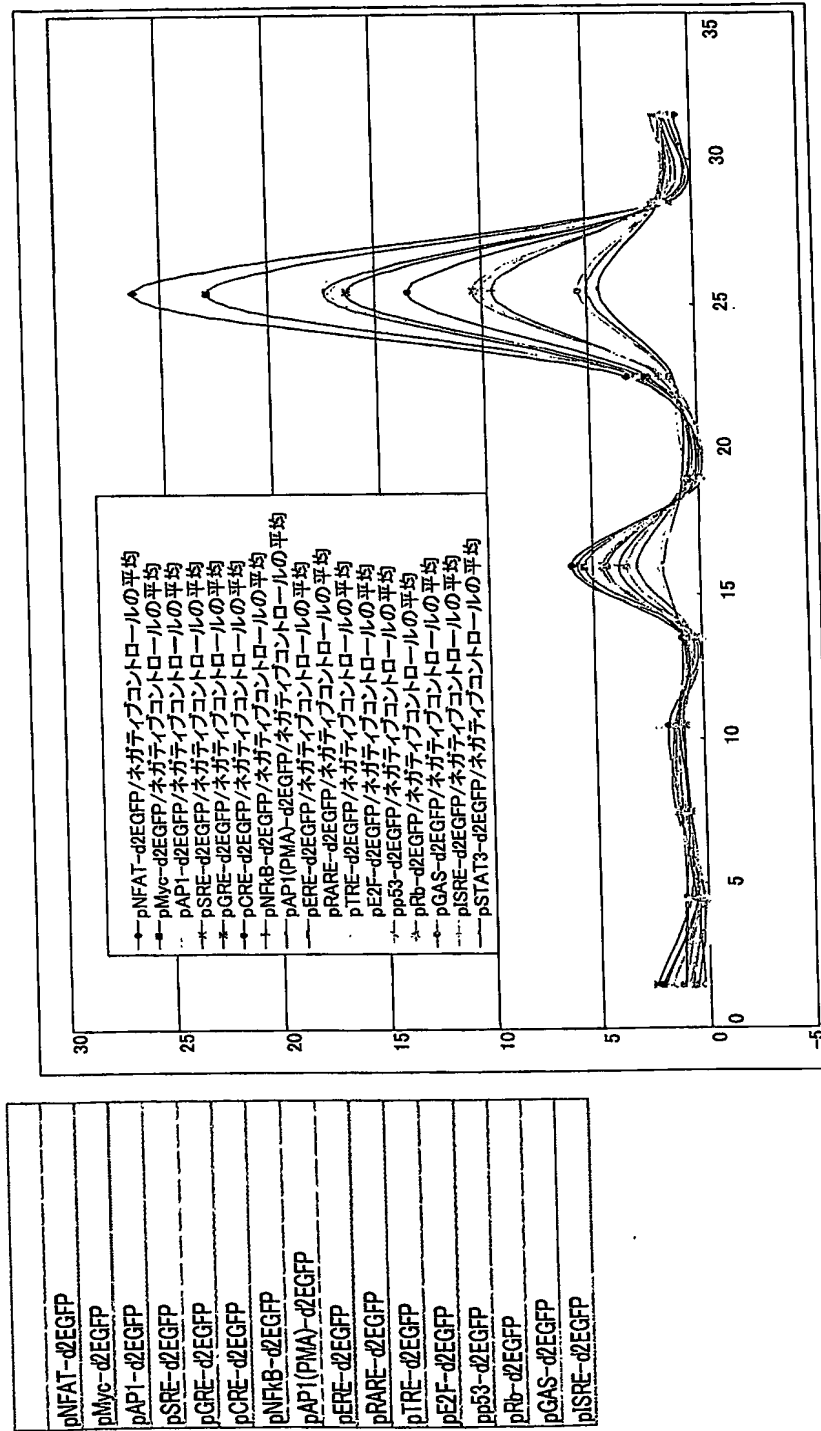
	0-31.5時間	17.5-31.5時間	0-17.5時間
A	+	+	+
B	+	+	-

任意のレポーターの抽出時( $A+B+\dots+n$ )では、 $n$ 個の波型を積算し、これを $n$ で割った平均の波形を作成し、閾値以上の変動を変化と見なした。



【図19】

間葉系幹細胞の骨芽細胞分化及び、未分化維持条件において左に示した17種類  
 類の転写因子をレポーターとし、これらの発現プロファイルを経時的に取得した。

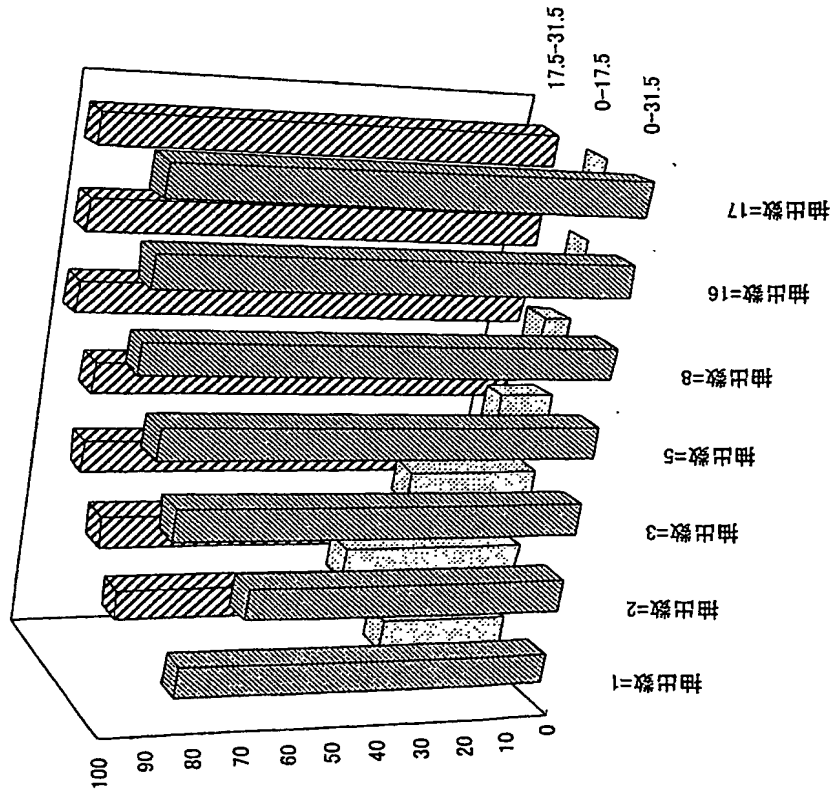


この17種類のプロファイルから、任意の数のプロファイルを抽出し、前述(図18)の方法によって、各転写因子の応答プロファイルを変動幅を基準として評価した。

【図20】

分化誘導初期において任意に抽出される組み合わせを変化させたとき、以下のような結果を得た。抽出数は、17のレポーター群から任意にその数のレポーターを抽出し、図18に示した方法によって平均プロファイルを算出後、変動幅 $\geq 5$ の変動を示したものを、誘導開始から0-31.5、0-17.5、17.5-31.5時間の区間で評価した結果である。各抽出条件において、その抽出数は17通りである(ただし、抽出数17は1通り)。この組み合わせの内、いくつかの組み合わせで、変動があると判断された割合を示した表に示し、下図にそのグラフを示した。

TH=5	Day0-1	0-31.5	0-17.5	17.5-31.5
分化誘導	抽出数=1	82.35294	29.41176	82.35294
	抽出数=2	70.58824	41.17647	88.23529
	抽出数=3	88.23529	29.41176	94.11765
	抽出数=5	94.11765	11.76471	94.11765
	抽出数=8	100	5.882353	100
	抽出数=16	100	0	100
	抽出数=17	100	0	100

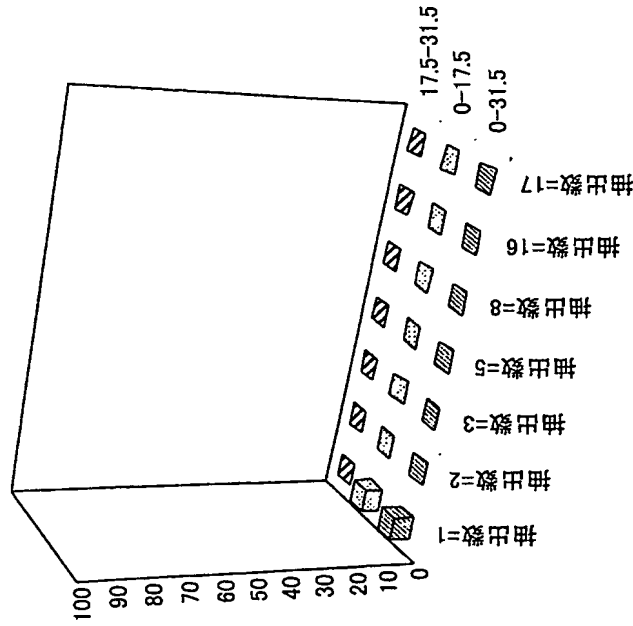


この解析より、分化のごく初期に関しては、分化誘導を把握できないが、約15時間後以降においては、確認できる。尚、変化を認めた割合が100%となった、任意の抽出数は、本場合においては、8以上であった。

【図 2 1】

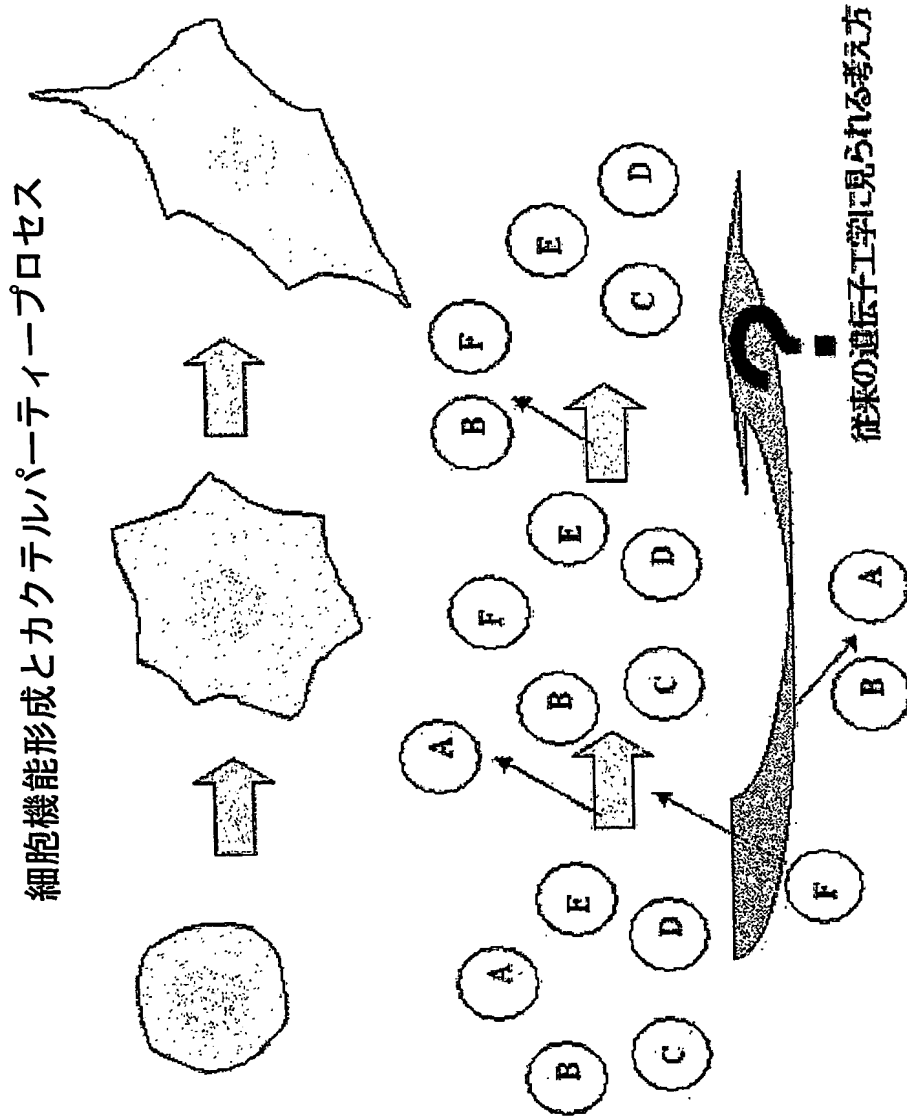
分化誘導なし	0-31.5	0-17.5	17.5-31.5
抽出数=1	5.882353	5.882353	0
抽出数=2	0	0	0
抽出数=3	0	0	0
抽出数=5	0	0	0
抽出数=8	0	0	0
抽出数=16	0	0	0
抽出数=17	0	0	0

図20と同様に、未分化維持条件において任意に抽出される組み合わせを変化させたとき、以下のような結果を得た。



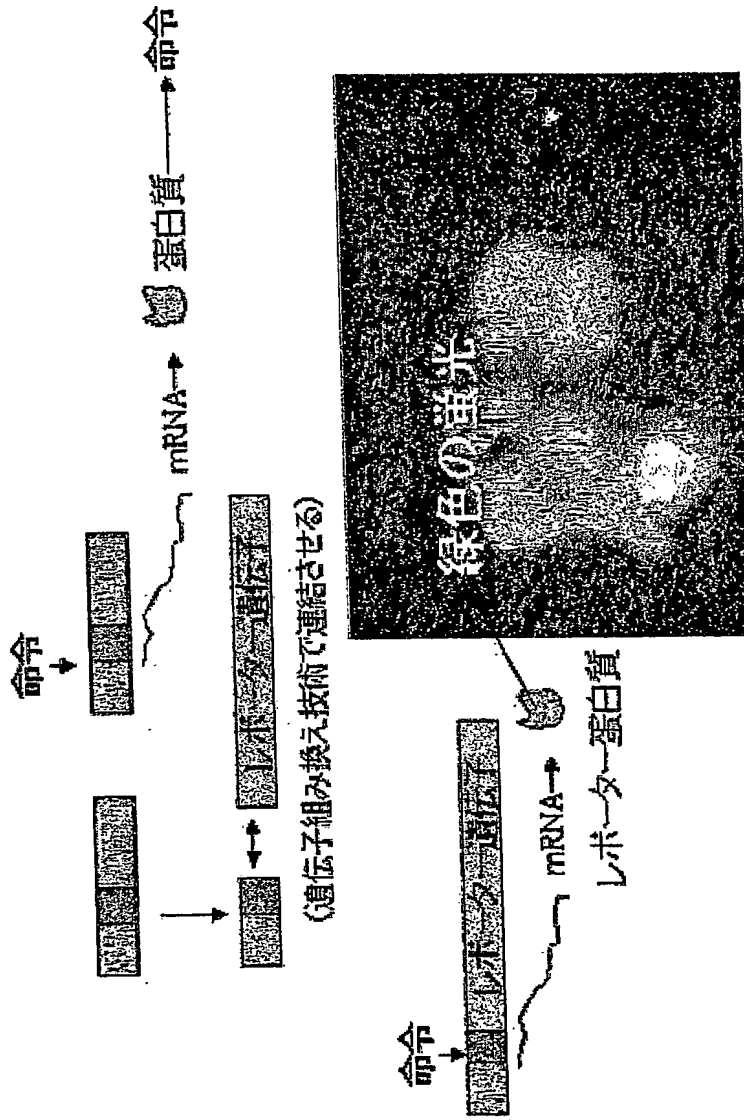
前述の分化誘導時の結果と比較すると、大きく異なる。この比較によって、細胞が分化誘導に向かっているのか未分化を維持しているのかを判断することが出来ると思われる。

【図22】



遺伝子転写スイッチポーター

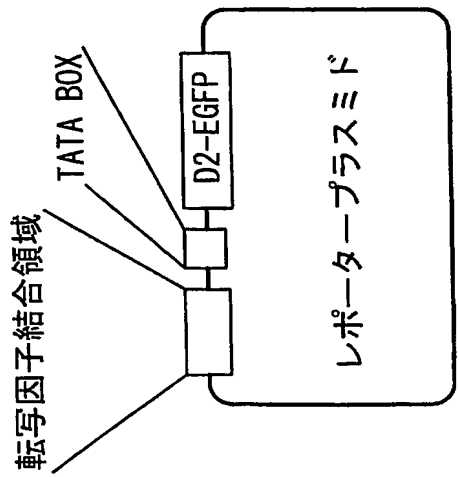
【図23】





【図 24】

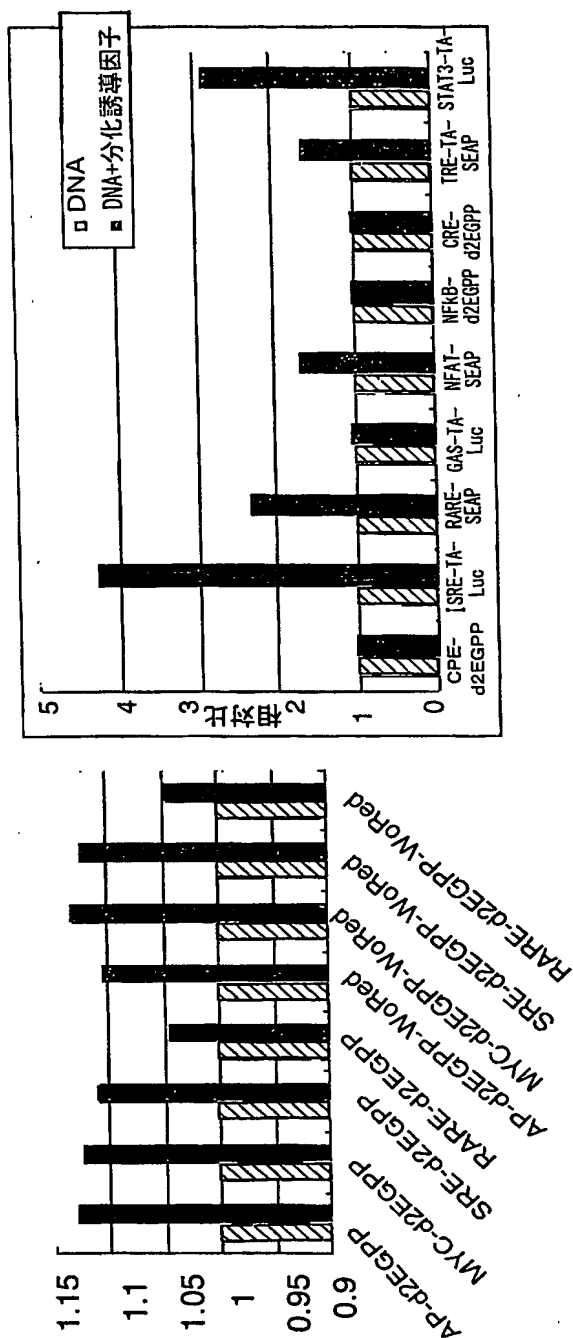
転写因子レポーターセットの構築



ベクター各	経路	転写因子	シス作用性 エンハンスメント
p NFkB-d2FGFP	IKK/NFkB	NFkB	kB
pAP1-d2FGFP	SAPK/JNK	c-Jun, c-Fos	AP1
pSRF-d2FGFP	MAPK/JNK, MAPK/ERK	Flk-1, STAT, TCF, SRF	SRF
pGRF-d2FGFP	グルココルチコイド (HXP90媒介)	GR	GRF
pCRF-d2FGFP	PKA/CRFB, JNK/p38 PKA	ATF2/CRFB	CRF
pMyc-TA-d2FGFP, pMYC-d2FGFP	細胞周期	c-myc	F-box
pHSF-d2FGFP	HSF	HSF	HSF
pNFAT-d2FGFP	NFAT/calcineurin/PKC	NFAT	NFAT
pAP1 (PMA)-TA-d2FGFP	PKC		AP1 (PMA)
pRb-TA-d2FGFP	細胞周期		Rb
pF2F-TA-d2FGFP	細胞周期		F2F
pp53-TA-d2FGFP	細胞周期/アポトーシス		P53
pGAM-TA-d2FGFP	JAK/STAT	STAT1/STAT1	GAS
pISRF-TA-d2FGFP	JAK/STAT	STAT2/STAT1	ISRF
pSTAT3-TA-d2FGFP	JAK/STAT	STAT3/STAT3	STAT3
pFRF-TA-d2FGFP	エストロゲン/レセプター		FRF
pRARF-TA-d2FGFP	レチノン酸		RARF
pTRF-TA-d2FGFP	チロイドレセプター		TRF

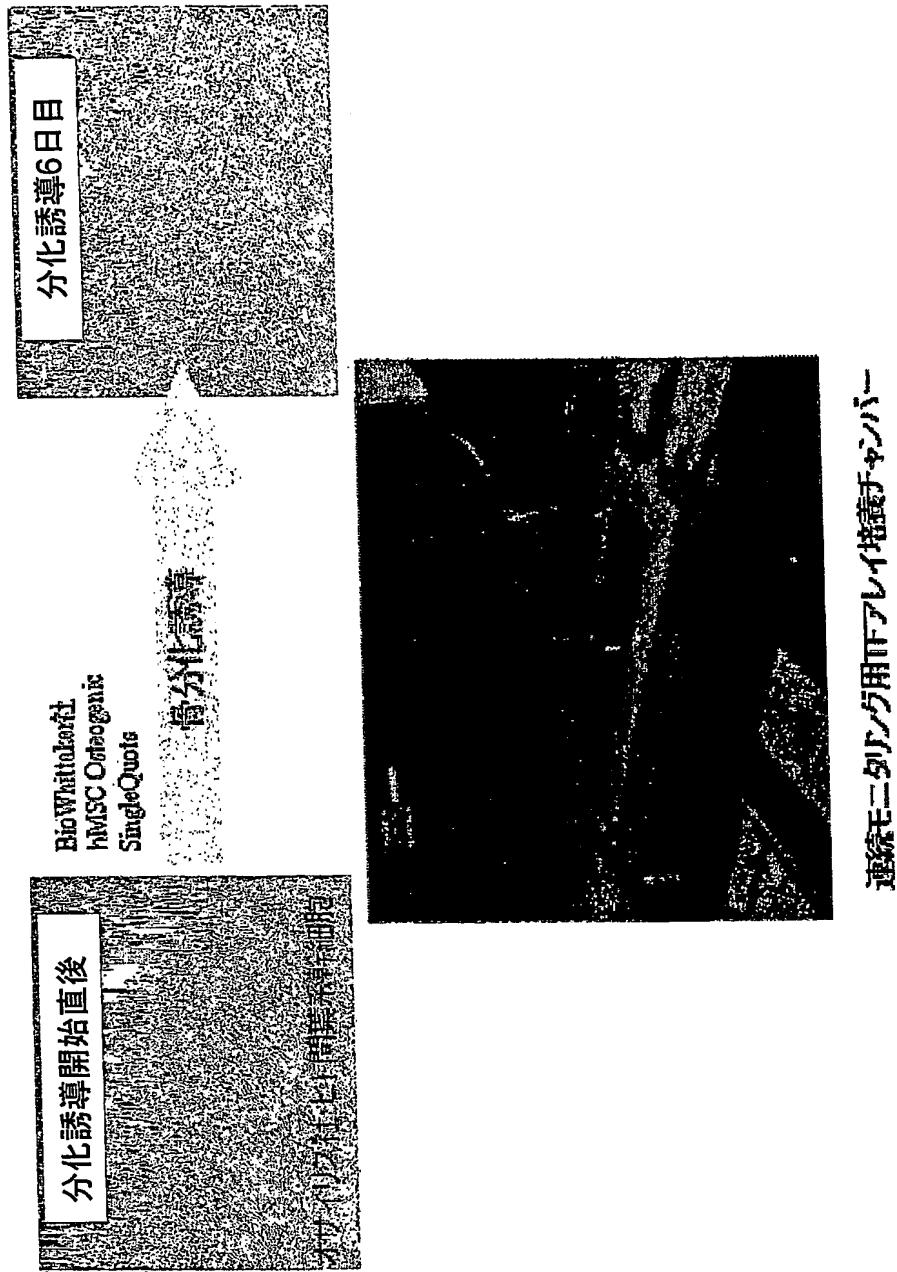
【図 25】

# 転写因子レポーターのアッセイ



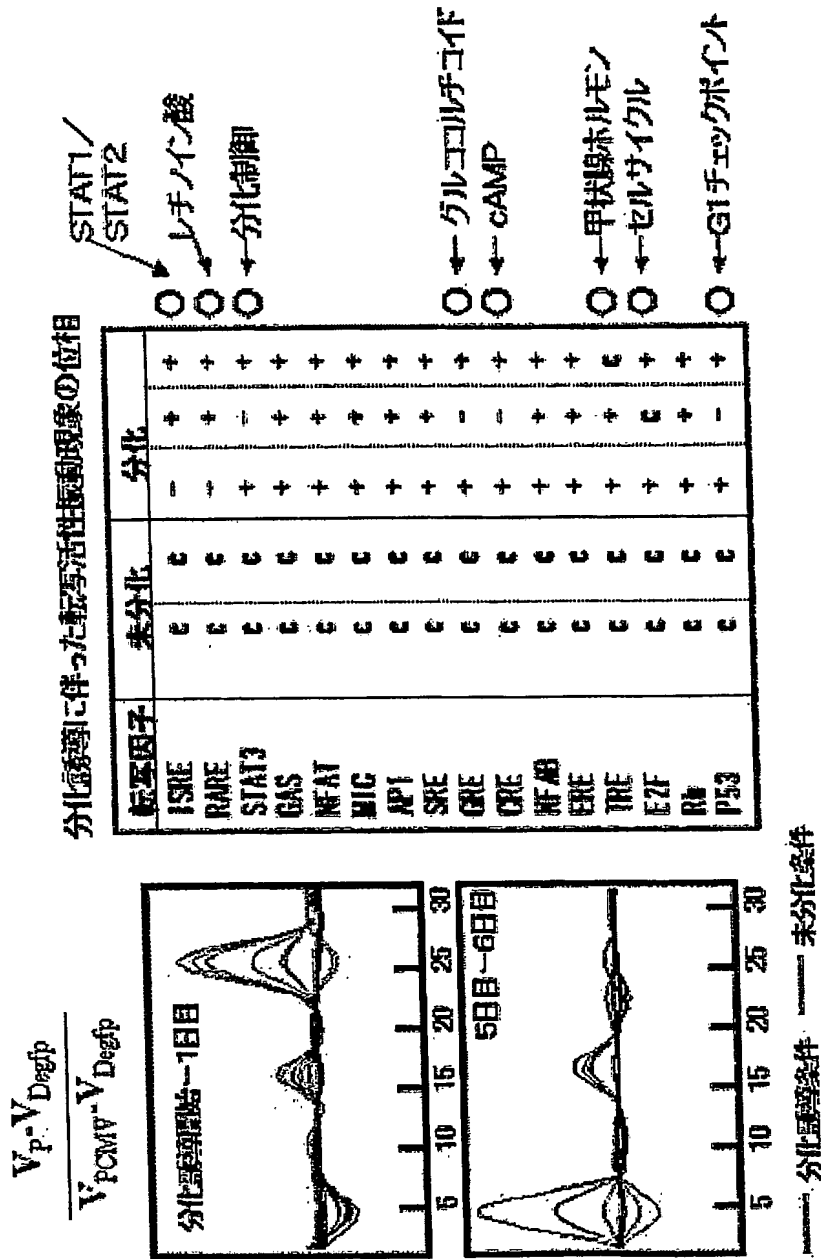
【図26】

骨分化過程における  
転写因子活性の時系列測定

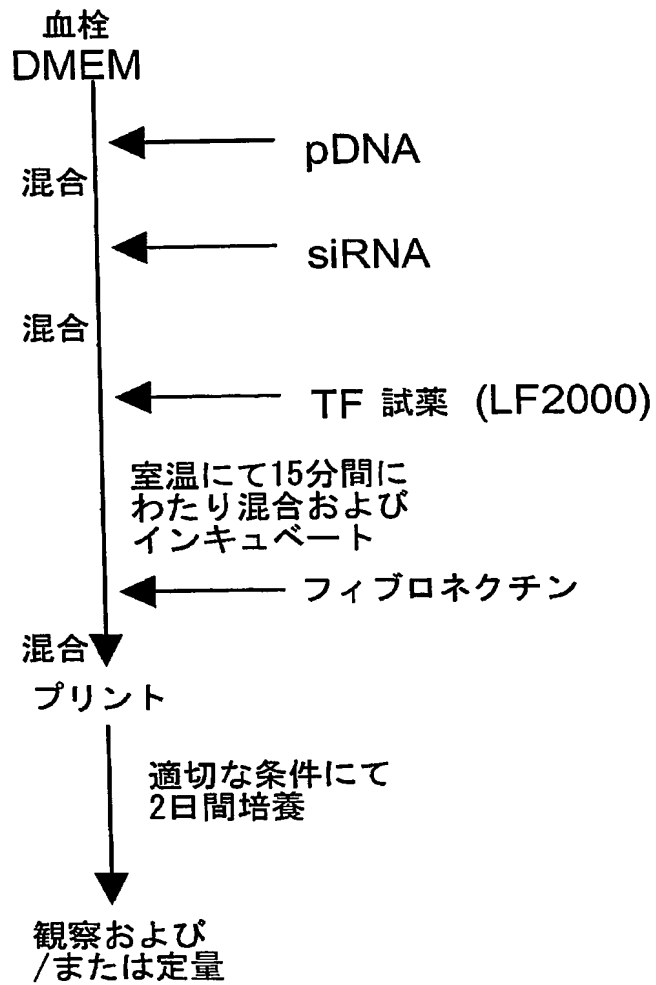


【図27】

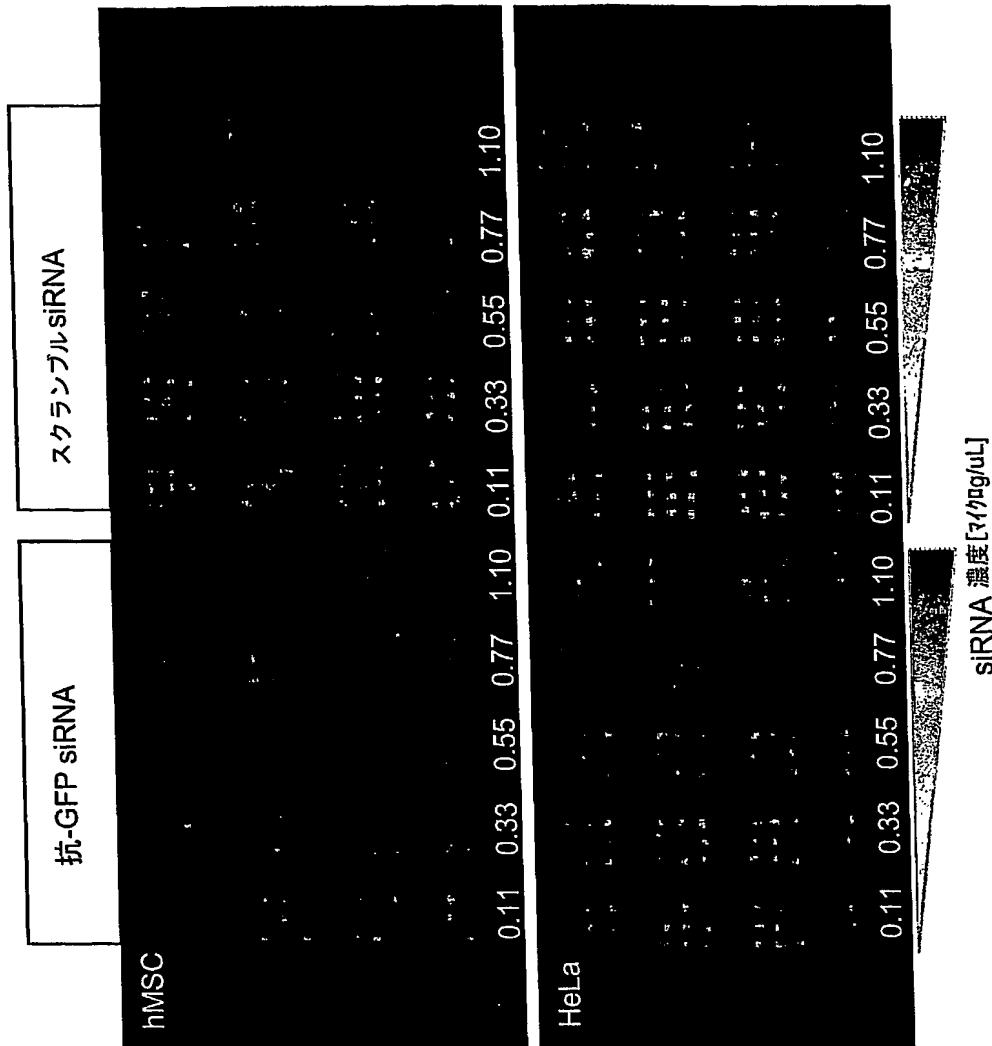
転写因子活性の振動現象と位相解析



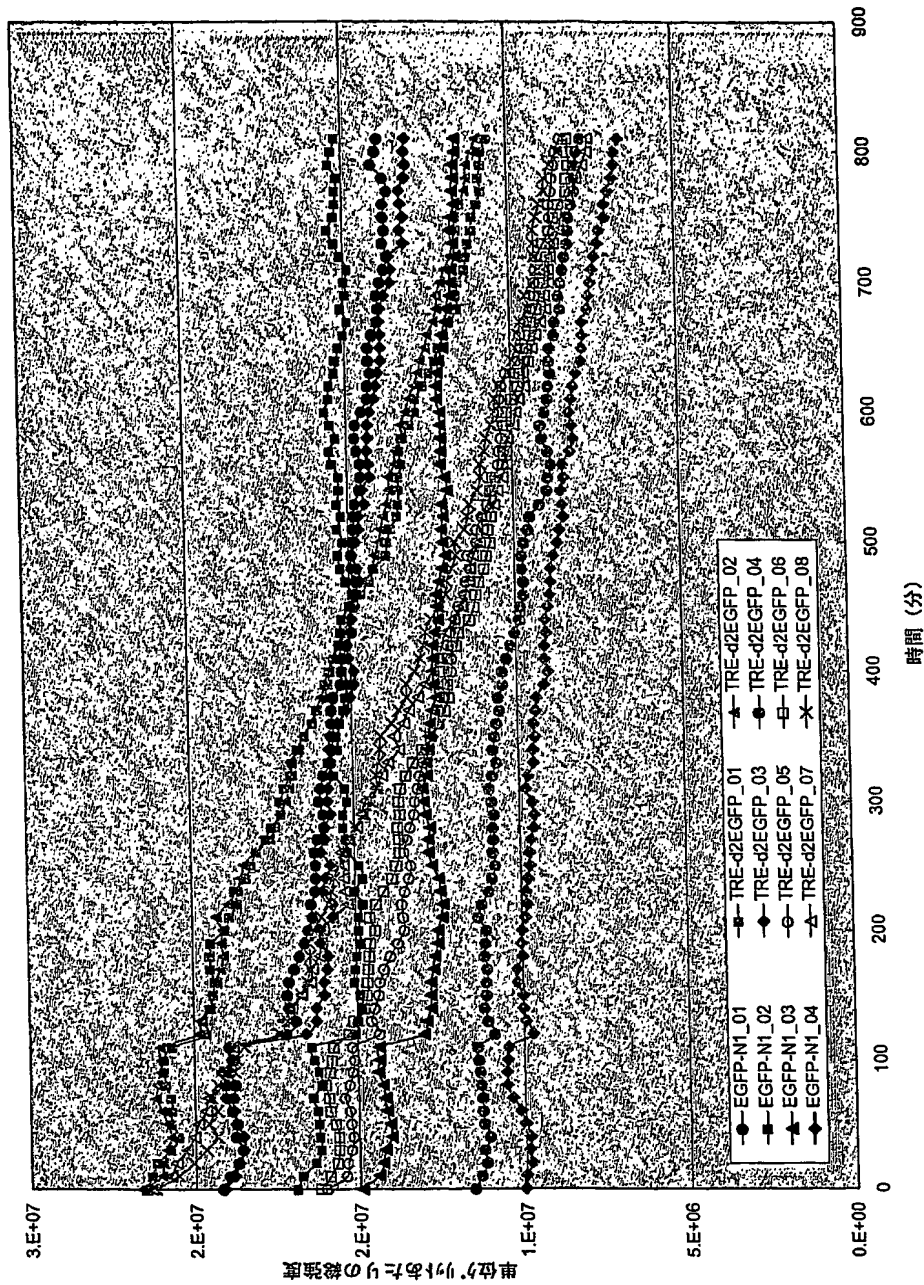
【図 28】



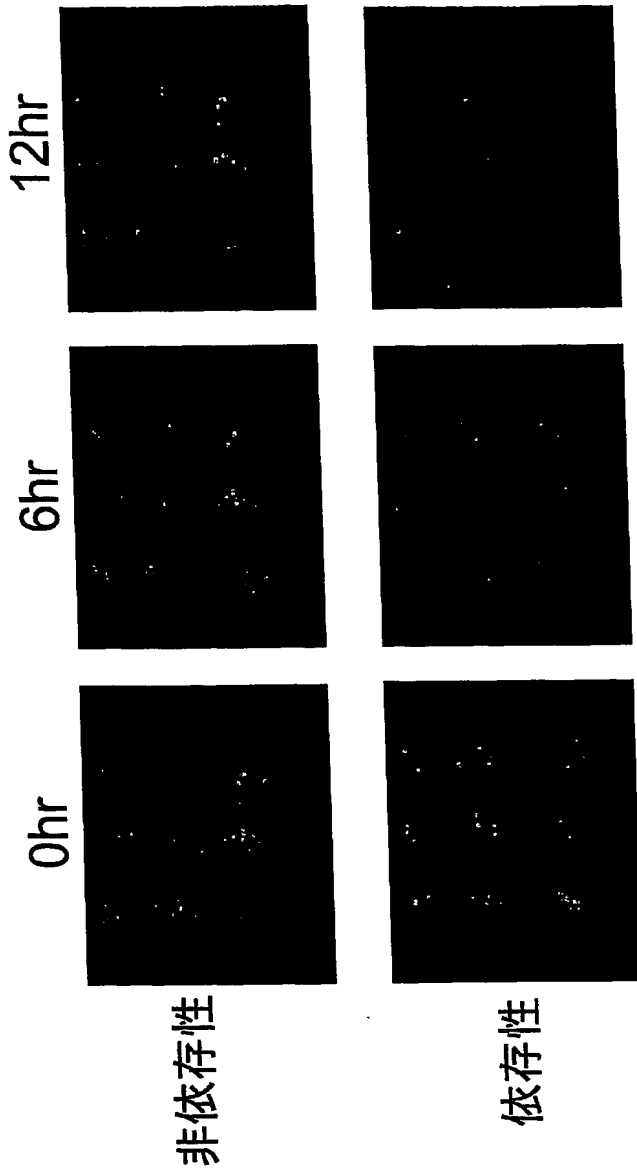
【図 29】



【図 30】



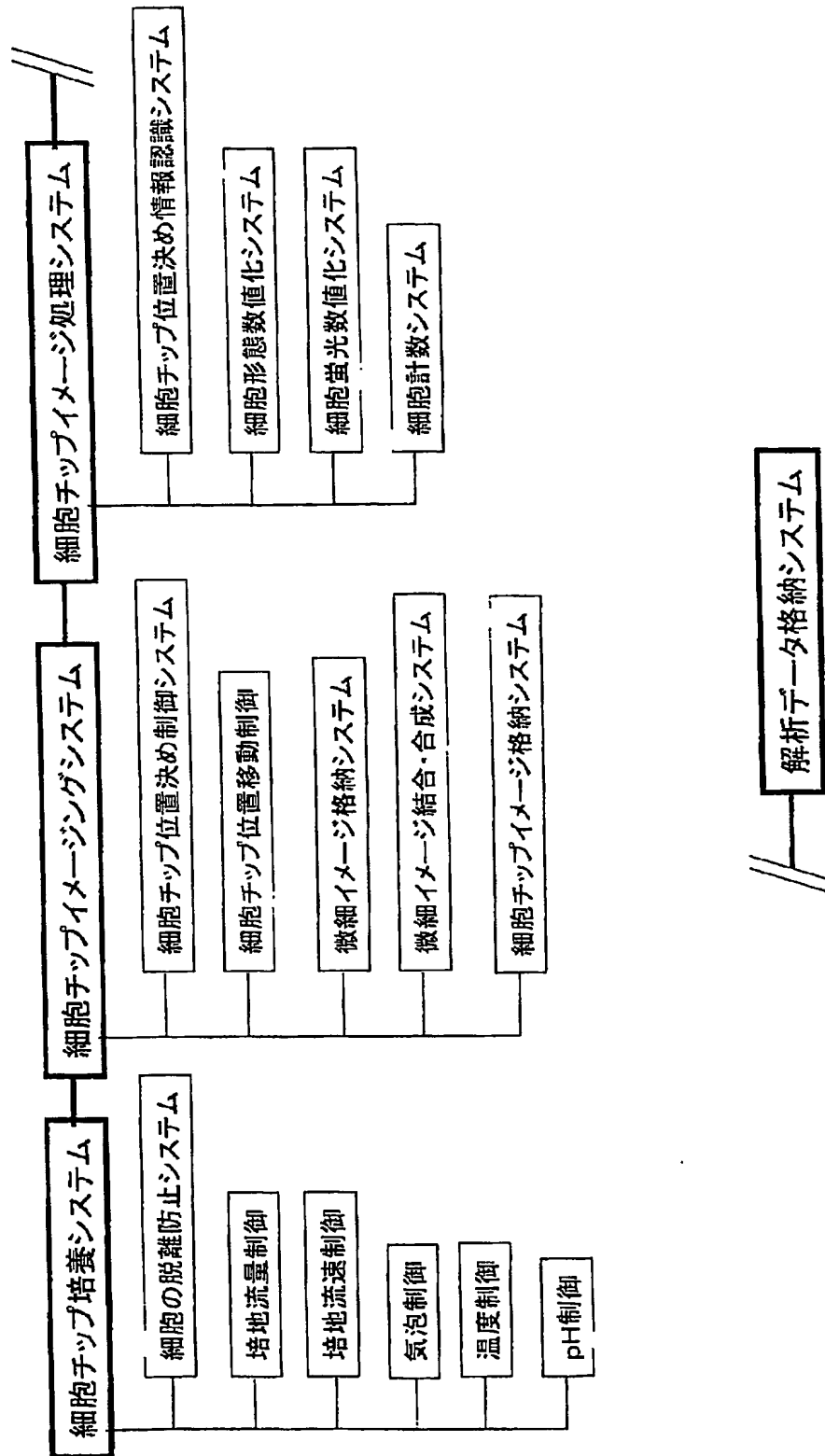
【図 31】





【図32】

細胞プロファイルデータ生成のための装置システム図



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

細胞の実際の状態をプロフィールとしてデータ生成するための方法およびシステムを提供することを課題とする。経時的および／またはリアルタイムで細胞内の情報を、複雑系という観点でそのままあるいは直接的に提示するシステムおよび方法を提供することもまた課題とする。

【解決手段】

複数の同一環境にある細胞の情報に関するプロフィールデータを生成する方法であって、a) 複数の細胞を同一環境を保つことができる支持体上に配置する工程；およびb) 該細胞上または該細胞内の生物学的因子またはその集合体を経時的にモニターして該細胞のプロファイルのデータを生成する工程；を包含する、方法。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 1 8 1 9 1 5

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 3 0 1 0 2 1 5 3 3 ]

1. 変更年月日

2 0 0 1 年 4 月 2 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区霞が関 1 - 3 - 1

氏 名

独立行政法人産業技術総合研究所

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**